

**Aus dem Institut für Klinische Chemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Vorstand: apl. Prof. Dr. med. Michael Vogeser**

HPLC-MS/MS Analyse von Immunsuppressiva direkt in Vollblut

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Apothekerin und Diplom-Pharmazeutin

Irayani Berger

aus

Malang / Indonesien

Jahr

2010

Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Michael Spannagl

Prof. Dr. Jan Braess

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. Rosa Morello

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

17.12.2010

*Meinen Eltern
und meinem Ehemann Jens*

„Zeit, die wir uns nehmen, ist Zeit, die uns etwas gibt.“

(Ernst Ferstl)

An dieser Stelle möchte ich mich als erstes ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Dr. Karl-Siegfried Boos, als dem Leiter des Laboratoriums für BioSeparation, für die äußerst interessante Themenstellung, die Förderung meiner wissenschaftlichen und analytischen Denkweise durch anregende Diskussionen und für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf nationaler und internationaler Ebene präsentieren zu können, bedanken. Besonders möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und das entgegengebrachte Vertrauen sowie für die Möglichkeit zu einem Forschungsaufenthalt in Shanghai bedanken.

Frau Apothekerin Dr. Rosa Morello, als der Leiterin des Forschungsprojektes, danke ich herzlich für die intensive wissenschaftliche Betreuung, die Unterstützung und die vielfältigen Anregungen.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Dietrich Seidel, Leiter des Institutes für Klinische Chemie, danke ich für das entgegengebrachte Interesse.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn apl. Professor Dr. Michael Vogeser (kommissarischer Leiter des Institutes für Klinische Chemie) und seinen Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Rob Castien als ehemaligen und Herrn Rob van der Knaap als derzeitigen Geschäftsführer der Firma Spark Holland B.V. (Emmen, Niederlande) möchte ich für die gute Kooperation und das zur Verfügung stellen der Analysengeräte und weiterer Arbeitsmaterialien danken. Des Weiteren danke ich deren Mitarbeitern für die engagierte Unterstützung sehr. Namentlich benennen möchte ich hierbei Herrn Otto Halmingh, Herrn Dr. Emile Koster, Herrn Germen Gijlers, Herrn Bert Ohms, Herrn Edwin Görtz, Herrn Peter Ringeling und Herrn Michel Koch.

In diesem Zusammenhang bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Forschungsprojektes (E!4112) bei EUREKA.

Herrn Yasser Ismail (Waters Corp., Milford, USA) danke ich für die Bereitstellung spezieller SPE-Kartuschen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Klaus Bischoff (Bischoff Chromatography, Leonberg) für die Bereitstellung der POPLC-Säulen. Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Lamotte für seine stetigen fachkundlichen Ratschläge und Diskussionen bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Fritz Sörgel, dem Direktor des Instituts für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung (Nürnberg-Heroldsberg) für die Möglichkeit an dem Tandem-Massenspektrometer (API 5000) Proben messen zu dürfen. Einen großen Dank möchte ich seiner Laborleiterin Frau Dr. Martina Kinzig für ihre engagierte und fachkundige Unterstützung bei der Durchführung der zahlreichen Messungen aussprechen.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Bernd Engelmann bedanken. Ein ganz herzlicher Dank gilt auch Frau Susanne Pfeiler für die Aufnahme der konfokal-mikroskopischen Bilder.

Den Mitarbeitern des Institutes für Klinische Chemie danke ich für stetige Hilfe und Aushilfe. Allen freiwilligen Blutspendern sei hier ein besonderer Dank gewidmet.

Für die nette und freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen arbeits- und diskussionsreichen Stunden, die wir zusammen im Labor verbracht haben, möchte ich mich bei meiner Co-Doktorandin Frau Apothekerin Dr. Jelena Milojković bedanken.

Bei Frau Melita Fleischmann möchte ich mich für die Instandhaltung des Labors und vor allem für ihre freundschaftliche Verbundenheit ganz herzlich bedanken.

Meiner Co-Doktorandin Frau Diplom-Chemikerin Qianqian Yu möchte ich ebenfalls für die freundschaftliche Zusammenarbeit danken.

Ein großer Dank gilt Frau Professor Dong-ying Chen für die intensive und freundschaftliche Betreuung während meines Forschungsaufenthaltes am Institut Materia Medica in Shanghai.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Maria Mezger, Frau Dr. Surong Mei, Frau Dr. Valentina Costa und Herrn Dr. Xianzhe Shi für die angenehme Zusammenarbeit im Laboratorium für BioSeparation bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Wolfgang und Gisa, meinem Bruder Manuel und meinem Ehemann Jens für die ununterbrochene seelische Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | XVII |
|-----------------------------------|-------------|

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | KLINISCH-CHEMISCHE HPLC-MS/MS ANALYTIK VON VOLLBLUTPROBEN: STAND DER TECHNIK | 1 |
| 1.2 | ZIEL DER ARBEIT..... | 3 |
| 2 | ALLGEMEINER TEIL..... | 5 |
| 2.1 | AUFBEREITUNG BIOLOGISCHER FLÜSSIGKEITEN FÜR DIE LC-MS/MS ANALYSE..... | 5 |
| 2.1.1 | <i>Biologische Flüssigkeiten.....</i> | <i>5</i> |
| 2.1.1.1 | Blut, Plasma und Serum | 6 |
| 2.1.1.2 | Zell-desintegriertes Blut (Cell-disintegrated Blood, CDB) | 10 |
| 2.1.2 | <i>Sekundäre Matrixbestandteile in Vollblut.....</i> | <i>11</i> |
| 2.1.2.1 | „Ghosts“ | 11 |
| 2.1.2.2 | Mikropartikel..... | 12 |
| 2.1.2.3 | Subzelluläre Partikel..... | 13 |
| 2.1.3 | <i>Anforderungen an die Probenaufbereitung</i> | <i>13</i> |
| 2.1.4 | <i>Verfahren für die Probenaufbereitung</i> | <i>14</i> |
| 2.1.4.1 | Proteinpräzipitation | 15 |
| 2.1.4.2 | Flüssig-Flüssig Extraktion (Liquid-Liquid Extraction, LLE) | 16 |
| 2.1.4.3 | Hämolyse..... | 16 |
| 2.1.4.4 | Getrocknete Blutflecken (Dried Blood Spots, DBS) | 17 |
| 2.1.4.5 | Hitzeschockbehandlung..... | 18 |
| 2.1.4.6 | Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE)..... | 18 |
| 2.2 | METHODENENTWICKLUNG IN DER BIOANALYTIK | 19 |
| 2.2.1 | <i>Methodenentwicklung in der Probenaufbereitung.....</i> | <i>19</i> |
| 2.2.1.1 | Automatisierung der Festphasenextraktion | 20 |
| 2.2.1.2 | Multidimensionale Chromatographie | 21 |
| 2.2.1.3 | Säulenschalten (column switching) | 22 |
| 2.2.1.4 | SPE-Materialien | 25 |
| 2.2.2 | <i>Methodenentwicklung in der bioanalytischen HPLC.....</i> | <i>30</i> |
| 2.2.2.1 | Konventionelle Methodenentwicklung..... | 31 |
| 2.2.2.2 | Phasen-optimierte Flüssigkeitschromatographie (Phase Optimized Liquid Chromatography, POPLC) | 32 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.3 | MASSENSPEKTROMETRIE IN DER BIOANALYTIK | 35 |
| 2.3.1 | <i>Prinzip der Massenspektrometrie</i> | 35 |
| 2.3.2 | <i>Ionisationstechniken</i> | 36 |
| 2.3.2.1 | Elektrospray-Ionisation (Electrospray Ionisation, ESI) | 37 |
| 2.3.2.2 | Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI) und Atmosphärendruck-Photoionisation (Atmospheric Pressure Photo Ionisation, APPI) | 38 |
| 2.3.3 | <i>Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)</i> | 39 |
| 2.3.3.1 | Aufbau | 40 |
| 2.3.3.2 | Tandem-massenspektrometrische Modi operandi | 41 |
| 2.3.4 | <i>Kopplung von Flüssigkeitschromatographie an die Massenspektrometrie (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)</i> | 43 |
| 2.3.5 | <i>Matrixeffekte in der bioanalytischen HPLC-MS/MS</i> | 44 |
| 2.3.5.1 | Definition von Matrixeffekten | 45 |
| 2.3.5.2 | Ursachen und Mechanismen der Matrixeffekte | 45 |
| 2.3.5.3 | Bestimmung von Matrixeffekten | 47 |
| 2.3.5.4 | Lösungsansätze zur Eliminierung von Matrixeffekten | 50 |
| 2.3.6 | <i>Anwendung eines Internen Standard in der Bioanalytik</i> | 51 |
| 2.3.7 | <i>Massenkalibrierung in der Massenspektrometrie</i> | 53 |
| 2.4 | IMMUNSUPPRESSIVA | 53 |
| 2.4.1 | <i>Pharmakodynamik der Immunsuppressiva</i> | 54 |
| 2.4.1.1 | Wirkmechanismus der Immunsuppressiva | 55 |
| 2.4.1.2 | Anwendung und Dosierung von Immunsuppressiva | 57 |
| 2.4.1.3 | Nebenwirkung der Immunsuppressiva | 58 |
| 2.4.1.4 | Interaktionen der Immunsuppressiva | 60 |
| 2.4.2 | <i>Pharmakokinetik der Immunsuppressiva</i> | 61 |
| 2.4.3 | <i>Therapeutische Arzneimittelkontrolle (Therapeutic Drug Monitoring, TDM)</i> | 64 |
| 2.4.3.1 | Definition TDM | 64 |
| 2.4.3.2 | Indikationen und Voraussetzungen für ein TDM | 64 |
| 2.4.3.3 | TDM der Immunsuppressiva | 65 |
| 2.4.4 | <i>Analytik der Immunsuppressiva</i> | 67 |
| 3 | EXPERIMENTELLER TEIL: ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 71 |
| 3.1 | CHARAKTERISIERUNG DER NEUEN MATRIX: ZELL-DESINTEGRIERTES BLUT (CELL-DISINTEGRATED BLOOD, CDB) | 71 |
| 3.1.1 | <i>Charakterisierung der Matrix durch Lichtmikroskopische Untersuchungen</i> | 71 |
| 3.1.2 | <i>Charakterisierung der Matrix durch Konfokale Laser-Elektronenmikroskopie</i> | 73 |
| 3.1.3 | <i>Charakterisierung der CDB Matrix durch differentielle Zentrifugation</i> | 78 |
| 3.2 | AUFBAU EINES VOLLAUTOMATISIERTEN ANALYSENSYSTEMS | 82 |
| 3.2.1 | <i>Instrumenteller Grundaufbau</i> | 82 |
| 3.2.2 | <i>Instrumenteller Aufbau und Funktionsweise des Analysensystem für die automatisierte Bestimmung von Pharmaka in Vollblut</i> | 83 |
| 3.2.3 | <i>Modifikation des Symbiosis Pharma Systems</i> | 84 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.3 | ENTWICKLUNG EINER MD-SPE-POPLC-MS/MS METHODE ZUR BESTIMMUNG VON IMMUNSUPPRESSIVA AUS VOLLBLUT | 90 |
| 3.3.1 | <i>Entwicklung und Optimierung der Vorgänge in der Probenmisch- und Injektionseinheit ..</i> | 91 |
| 3.3.2 | <i>Beschreibung der In-line Prozessierung von Vollblutproben</i> | 97 |
| 3.3.3 | <i>Entwicklung und Kopplung einer Methode zur Aufbereitung einer Prozessierten Vollblutprobe (CDB) mittels on-line SPE.....</i> | 98 |
| 3.3.3.1 | Auswahl geeigneter SPE- Sorbentien und mobiler Phasen..... | 98 |
| 3.3.3.2 | Bestimmung von Kenngrößen für die Aufreinigung von biologischen Matrices..... | 99 |
| 3.3.3.3 | Bestimmung der Ventilschaltzeiten | 118 |
| 3.3.4 | <i>Ermittlung einer POPLC-Segmentkombination für den analytischen Trennvorgang.....</i> | 120 |
| 3.3.4.1 | Anforderungen und Ziele an den Trennvorgang | 121 |
| 3.3.4.2 | Bestimmung der POPLC-Segmentkombination für den Trennvorgang..... | 124 |
| 3.3.4.3 | Überprüfung und zeitliche Ermittlung des Auftretens von Matrixeffekten bei Messungen mit verschiedenen POPLC-Segmentkombinationen | 128 |
| 3.3.5 | <i>Optimierung der „Tuning“-Parameter zur spezifischen Steigerung der Ionisationsausbeute der Analyte</i> | 132 |
| 3.3.6 | <i>Zusammenstellung der Analysenmethode.....</i> | 134 |
| 3.3.7 | <i>MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode als allgemeine Plattform für die Analyse weiterer Wirkstoffe.....</i> | 142 |
| 3.4 | EVALUATION DER ENTWICKELTEN MD-SPE-POPLC-MS/MS METHODE (TRIPLE-KARTUSCHEN MODUS)..... | 145 |
| 3.4.1 | <i>Bestimmung der Robustheit einzelner Untereinheiten der MD-SPE-POPLC-MS/MS Plattform</i> | 145 |
| 3.4.1.1 | Bestimmung der Robustheit der Prozessierungseinheit..... | 145 |
| 3.4.1.2 | Bestimmung der Robustheit der Kartuschen | 150 |
| 3.4.2 | <i>Vergleich der Robustheit einer konventionellen on-line SPE-LC-MS/MS Methode mit und ohne integrierter Hitzeschockbehandlung bei der Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut</i> | 152 |
| 3.4.2.1 | Untersuchungen zur Wiederfindung der Modellanalyte aus verschiedenen Matrices..... | 153 |
| 3.4.2.2 | Untersuchungen zur Verschleppung von Hämoglobin im Analysensystem..... | 156 |
| 3.4.3 | <i>Vergleich verschiedener Innendurchmesser einer POPLC-Säule.....</i> | 162 |
| 3.4.4 | <i>Bestimmung von Matrixeffekten der biologischen Flüssigkeit CDB bei der Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut nach on-line Probenaufbereitung über verschiedene Plattformen.....</i> | 165 |
| 3.4.5 | <i>Untersuchungen an interferierenden (Phospho-)Lipiden in der CDB-Matrix und zu deren Entfernung.....</i> | 174 |
| 3.4.6 | <i>Bestimmung der Zusammensetzung der nach on-line SPE-Aufbereitung verbleibenden CDB-Matrix.....</i> | 176 |
| 3.4.6.1 | Probenaufbereitung und Trennung über verschiedene Plattformen. | 177 |
| 3.4.6.2 | Probenaufbereitung über verschiedene SPE-Packungsmaterialien und MD-SPE-POPLC Methode (Triple-Kartuschen Modus)..... | 180 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.5 | ENTWICKLUNG EINER METHODIK ZUR REINIGUNG DER PROZESSIERUNGSEINHEIT UND DER KAPILLAREN DER ANALYSENPLATTFORM | 182 |
| 3.5.1 | <i>Ermittlung eines effizienten Reinigungsreagenzes</i> | 183 |
| 3.5.2 | <i>Beschreibung eines Reinigungszyklusses und der Reinigungskonditionen für das Analysensystem mit dem BCA-Protein-Reagenz</i> | 187 |
| 3.5.3 | <i>Adaption der off-line Proteinbestimmung zur Verwendung in einem on-line System – Quantifizierung des „Biofilms“ in der Prozessierungseinheit und in den Kapillaren.....</i> | 188 |
| 3.5.4 | <i>Evaluation des entwickelten Reinigungsverfahrens</i> | 190 |
| 3.5.4.1 | Untersuchungen des Einflusses des Materials der Kapillaren und dessen Oberflächenbeschaffenheit auf die Entstehung eines „Biofilms“ | 191 |
| 3.5.4.2 | Untersuchungen des Einflusses des Kapillarenmaterials und dessen Wärmeleitfähigkeit auf die Entstehung eines „Biofilms“ | 197 |
| 3.5.4.3 | Untersuchungen des Einflusses des Hämatokrits | 199 |
| 3.5.4.4 | Untersuchungen des Einflusses des Alters des Reinigungsreagenzes | 201 |
| 3.5.5 | <i>Untersuchungen zur Bildung von Agglomeraten während des Prozessierungs- und des Reinigungsverfahrens</i> | 202 |
| 3.6 | EIGNUNGSNACHWEIS DER MD-SPE-POPLC-MS/MS METHODE (TRIPLE-KARTUSCHEN MODUS) FÜR DIE ANALYSE VON IMMUNSUPPRESSIVA AUS VOLLBLUT | 204 |
| 3.6.1 | <i>Richtigkeit und Präzision</i> | 206 |
| 3.6.2 | <i>Selektivität und Spezifität</i> | 210 |
| 3.6.3 | <i>Kalibration / Linearität und Linearitätsbereich</i> | 210 |
| 3.6.4 | <i>Nachweis- und Bestimmungsgrenzen</i> | 212 |
| 3.6.5 | <i>Robustheit.....</i> | 213 |
| 3.6.6 | <i>Wiederfindung</i> | 214 |
| 3.7 | PARTIELLES KREUZVALIDIERUNGSVERFAHREN | 217 |
| 3.7.1 | <i>Richtigkeit und Präzision</i> | 218 |
| 3.7.2 | <i>Kalibration, Linearität und Linearitätsbereich</i> | 223 |
| 3.7.3 | <i>Nachweis- und Bestimmungsgrenze</i> | 226 |
| 3.7.4 | <i>Wiederfindung</i> | 227 |
| 3.8 | ANALYSE VON PATIENTENPROBEN | 231 |
| 4 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 237 |
| 5 | ANHANG..... | 245 |
| 5.1 | TABELLARISCHE ZUSATZINFORMATIONEN | 245 |
| 5.2 | GERÄTE UND MATERIALIEN | 257 |
| 5.3 | CHEMIKALIEN UND LÖSEMittel..... | 260 |
| 5.4 | GERÄTEPARAMETER..... | 262 |
| | LITERATURVERZEICHNIS | 265 |
| | ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS | 291 |

| | |
|--|---|
| FORSCHUNGSaufenthalt und Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit | 297 |
| Lebenslauf | FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT. |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| Å | Ångström (Längeneinheit: $1\text{ Å} = 0,1\text{ nm}$) |
| ACN | <u>A</u> cetonitril |
| ADS | <u>A</u> lky <u>l</u> - <u>D</u> iol- <u>S</u> ilica |
| APCI | Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (<u>A</u> tmospheric <u>P</u> ressure <u>C</u> hemical <u>I</u> onisation) |
| APPI | Fotoionisation unter Atmosphärendruck (<u>A</u> tmospheric <u>P</u> ressure <u>P</u> hotoion <u>I</u> onisation) |
| at-line | Einsatz von Robotern |
| AUC | Fläche unter der Kurve (<u>A</u> rea <u>U</u> nder The <u>C</u> urve) |
| BCA | Bicinchoninsäure (<u>B</u> i <u>C</u> hinchoninic <u>A</u> cid) |
| bzw. | beziehungsweise |
| C_0 | Anfangskonzentration |
| C_2 | Konzentration nach zwei Stunden |
| C_{\max} | maximale Konzentration |
| CDB | Zell-desintegriertes Blut (<u>C</u> ell- <u>D</u> isintegrated <u>B</u> lood) |
| CDB (N ₂) | CDB, welches durch Frieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei Raumtemperatur hergestellt wurde |
| CID | Stoßaktivierung (<u>C</u> ollision <u>I</u> nduced <u>D</u> issociation) |
| CN | Cyanopropyl-Silika Sorbens |
| CsA | Ciclosporin A |
| CyA | Ciclosporin A |
| CyD | Ciclosporin D |
| C18 EPS | Oktadekyl-Silika Sorbens mit eingebundener polarer Amidgruppe |
| C18 SH | endverschlossenes Oktadekyl-Silika Sorbens |
| PLR | Triacetyl-Silika Sorbens |
| Da | Dalton (Masseneinheit: $1\text{ Da} = 1\text{ u} = 1,660538782 \cdot 10^{-27}\text{ kg}$) |
| DCF | Zellmarkierungssubstanz grün (2', 7'- <u>D</u> i <u>C</u> hloro <u>F</u> luorescein) |

| | |
|------------------|--|
| d.h. | das heißt |
| DIC | Objektiv vom Konfokalen Laserelektronenmikroskop (<u>D</u> ifferential <u>I</u> nterferences <u>C</u> ontrast) |
| DMSO | <u>D</u> imethylsulfoxid |
| dp | Partikeldurchmesser (<u>d</u> iameter particle) |
| EDTA | <u>E</u> thylendiamintetraacetat |
| ED | Außendurchmesser (<u>E</u> xternal <u>D</u> iameter) |
| ESI | Elektrospray-Ionisation (<u>E</u> lectro <u>S</u> pray <u>I</u> onisation) |
| etc. | et cetera |
| eV | Elektronvolt (Energieeinheit: $1\text{eV} = 1,602176487 \cdot 10^{-19}\text{J}$) |
| FDA | amerikanische Arzneimittelkommission (<u>F</u> ederal <u>D</u> rug <u>A</u> dministration of the United States) |
| FK 506 | Tacrolimus |
| FKBP-12 | FK-Bindungsprotein-12 |
| Hb | Hämoglobin |
| HC | beheizte Edelstahlkapillare (<u>H</u> eated <u>C</u> apillary) |
| Hct | Hämatokrit |
| HPD | Hochdruckkolbenpumpe (<u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>D</u> ispensure) |
| HPLC | Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography) |
| H ₂ O | Wasser |
| ID | Innendurchmesser (<u>I</u> nnner <u>D</u> iameter) |
| IL-2 | Interleukin-2 |
| ImS | Immunsuppressiva |
| in-line | integral |
| IS | interner Standard (<u>I</u> nternal <u>S</u> tandard) |
| k.A. | keine Angaben |
| k' | Retentionsfaktor |
| LADME | Freisetzungs-Adsorptions-Verteilungs-Metabolisations-Extraktions-Modell (<u>L</u> iberation, <u>A</u> dsorption, <u>D</u> istribution, <u>M</u> etabolism and <u>E</u> xtraction Model) |
| LC | Flüssigkeitschromatographie (<u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography) |
| LLE | Flüssig-Flüssig-Extraktion (<u>L</u> iquid- <u>L</u> iquid <u>E</u> xtraction) |
| LLOD | unteres Detektionslimit (<u>L</u> ower <u>L</u> imit <u>O</u> f <u>D</u> etection) |

| | |
|-----------------|---|
| LLOQ | unteres Quantifizierungslimit (<u>L</u> ower <u>L</u> imit <u>O</u> f <u>Q</u> uantification) |
| Lsg. | Lösung |
| MCX | „mixed-mode“ Kationenaustauscher- und Umkehrphasensorbens (<u>M</u> ixed-mode <u>C</u> ation <u>e</u> Xchange and Reversed-Phase Sorbent) |
| MD-SPE | Multidimensionale Festphasenextraktion (<u>M</u> ulti <u>D</u> imensional <u>S</u> olid <u>P</u> hase <u>E</u> xtraction) |
| MeOH | Methanol |
| meq | Maßeinheit für Austauscherkapazität (<u>m</u> illi <u>e</u> quivalent) |
| MMP | “mixed-mode” Material (<u>M</u> ixed <u>M</u> ode <u>P</u> hase) |
| MRM | Detektion mehrerer Massenübergänge (<u>M</u> ultiple <u>R</u> eaction <u>M</u> onitoring) |
| MS | Massenspektrometer |
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometrie |
| mTOR | Kinase, die von den Wirkstoffen Sirolimus und Everolimus gehemmt wird (<u>m</u> ammalian <u>T</u> arget <u>O</u> f <u>R</u> apamycin) |
| m/z | Masse-zu-Ladungsverhältnis |
| NF-AT | nukleärer Faktor aktivierter Zellen |
| NH ₄ | Ammonium |
| NTI drugs | Arzneistoffe mit einer engen therapeutischen Breite (<u>N</u> arrow <u>T</u> herapeutic <u>I</u> ndex Drugs) |
| off-line | manuell |
| on-line | apparativ integriert |
| PEEK | Polyetheretherketon (<u>P</u> oly <u>E</u> ther <u>E</u> ther <u>K</u> etone) |
| pK _A | umgekehrt dekadischer Logarithmus der Säurestärke |
| POPLC | Phasen-optimierte Flüssigkeitschromatographie (<u>P</u> hase <u>O</u> ptimized <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography) |
| PP | Proteinpräzipitation |
| RAD | Sirolimus |
| RAM | Material mit eingeschränkter Zugänglichkeit (<u>R</u> estricted <u>A</u> ccess <u>M</u> aterial) |
| RP | Retentionsmechanismus auf einer Umkehrphase (<u>R</u> eversed <u>P</u> hase) |
| SD | Standardabweichung (<u>S</u> tandard <u>D</u> eviation) |
| SDZ-RAD | Everolimus |
| SPE | Festphasenextraktion (<u>S</u> olid <u>P</u> hase <u>E</u> xtraction) |
| t _A | Durchbruchzeit des Analyten |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| t_M | Elutionszeit der Matrix |
| t_{\max} | Zeitpunkt der höchsten Arzneimittel-Blutspiegelkonzentration |
| t_{\min} | minimale Heizdauer |
| t_T | Transferzeit |
| t_0 | Systemdurchflusszeit |
| TAS | Totales Analysensystem (<u>T</u> otal <u>A</u> nalyses <u>S</u> ystem) |
| TDM | Therapeutische Arzneimittelkontrolle (<u>T</u> herapeutic <u>D</u> rug <u>M</u> onitoring) |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor α (<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor- α) |
| t_R | Retentionszeit |
| u.a. | und andere / unter anderem |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett (<u>U</u> ltra <u>V</u> iolet) |
| VB | Vollblut |
| V_B | Durchbruchvolumen |
| V_E | Elutionsvolumen |
| V_F | Fraktionierungsvolumen |
| vol. % | Volumenprozent |
| Vybrant DiD | Zellmarkierungssubstanz rot (lipophiles C18-Dialkylcarbocyanin, als Perchlorat-Salz vorliegend) |
| V2A | Edelstahl |
| WCX | schwaches Kationenaustauscher- und Umkehrphasensorbens (<u>W</u> eak <u>C</u> ation <u>e</u> <u>X</u> change and Reversed-Phase Sorbent) |
| λ | Wellenlänge |
| z.B. | zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Klinisch-chemische HPLC-MS/MS Analytik von Vollblutproben: Stand der Technik

In der klinisch-chemischen und pharmazeutischen Routineanalytik erfolgt die Analyse von niedermolekularen Substanzen (Arzneistoffen, Metaboliten, Biomarkern,...) aus biologischen Matrices zunehmend mit gekoppelten Trenn- und Detektionssystemen wie zum Beispiel der HPLC-MS/MS. Ein vielfach diskutierter Aspekt ist dabei aktuell die direkte Analyse von Vollblut. Hierdurch kann die für die Analyse entnommene Probenmenge um ca. 50% reduziert werden, was bei pädiatrischen Patienten und Patienten auf der Intensivstation sowie bei kleinen Versuchstieren (z.B. Mäuse) von großem Vorteil ist, da die Vollblutspiegel therapeutischer und diagnostischer Substanzen direkt mit ihrer Wirkung korrelieren [1]. Über die Analyse von Vollblut und Plasma derselben Probe kann auch die Bindung von Wirkstoffen an zelluläre Blutbestandteile ermittelt und dadurch der Verteilungskoeffizient für einen gegebenen Wirkstoff berechnet werden [2-4].

Die Analytik niedermolekularer Verbindungen mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) erfordert oftmals noch mehrere manuelle Schritte. Der Grund hierfür ist die schwierig zu automatisierende Freisetzung der Analyte aus der Matrix, welche eine aufwendige Probenaufreinigung voraussetzt. Die momentan dominierende Probenaufbereitung für Humanplasma und Vollblut ist die Proteinpräzipitation unter Zugabe einer Mischung aus Zinksulfat und einem organischem Lösemittel.

Eine Möglichkeit auf dem Weg zur Vollautomatisierung der Vollblutanalytik bietet ein neuartiges Verfahren [2-3]. Bei dieser Methode wird Vollblut durch eine Hitzeschockbehandlung in eine neue Matrix, in das Zell-desintegrierte Blut (Cell-disintegrated Blood, CDB) umgewandelt. Dabei wird der Analyt aus den Blutzellen

freigesetzt und die Zellmembranen in subzelluläre Partikeln überführt. Dieses Verfahren ermöglicht darüber hinaus auch erstmals die vollautomatisierte Bestimmung des Verteilungskoeffizienten eines Pharmakons im Blutkompartiment [4].

CDB ist, ebenso wie Vollblut, eine sehr komplexe Matrix. Eine HPLC-MS/MS Analyse ist daher auf eine sehr sorgfältige und selektive Probenaufbereitung angewiesen. Insbesondere gilt es sogenannte Matrixeffekte zu minimieren. Bei Matrixeffekten handelt es sich um die Beeinflussung der Ionisation der Zielanalyte im Massenspektrometer. Diese treten vermehrt bei der in der Arzneistoffanalytik bevorzugt verwendeten Detektion mit Elektrospray-Ionisation auf. Sie können durch in der Probe enthaltene makro- und niedermolekulare Bestandteile verursacht oder durch Coelution von Analyten hervorgerufen werden. Zudem sind diese Effekte in biologischen Flüssigkeiten infolge der natürlichen Konzentrationsschwankungen endogener Substanzen nicht vorher zu bestimmen.

Basierend auf der sehr hohen Spezifität und Selektivität der Massenspektrometer wurde anfänglich häufig auf eine chromatographische Trennung der Analyte verzichtet („dilute and shoot“). Bei den heute gängigen Methoden steht ebenfalls ein hoher Probendurchsatz im Vordergrund. Es wird jedoch vorwiegend eine schnelle Trennung vor der Detektion durchgeführt. Dennoch kann es bei diesem Kopplungsverfahren aufgrund geringer chromatographischer Retention und Trennleistung auch zu Interferenzen durch Matrixeffekte kommen [5].

Eine Herausforderung an eine routinetaugliche Methode ist es daher, Arzneistoffe in sehr geringen Dosierungen selektiv, präzise und richtig in biologischen Flüssigkeiten zu quantifizieren. Dafür ist eine Probenaufbereitung durch chromatographische Abtrennung potenzieller Interferenzen aus dem komplexen Gemisch aus Zellbestandteilen, Proteinen, Salzen und anderen Stoffen erforderlich. Diese Aufbereitung setzt jedoch eine Freisetzung des geringen Anteils an Zielanalyten aus ihrer Proteinbindung voraus. Des Weiteren müssen sich gegenseitig im Detektionsprozess störende Analyte chromatographisch voneinander getrennt werden. Eine weitere Schwierigkeit besteht dabei in der Ähnlichkeit vieler Zielanalyte mit endogenen Matrixbestandteilen [6].

Eine adäquate Analyse erythrozytär gebundener Arzneistoffe mittels der modernen LC-MS/MS Analytik sollte daher effizient, selektiv, robust, ungestört und vollautomatisierbar sein.

1.2 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war die Entwicklung und Validierung einer vollautomatischen und störungsfreien Analysenplattform für die massenspektrometrische Bestimmung der vorwiegend erythrozytär gebundenen Immunsuppressiva Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus direkt in antikoaguliertem Vollblut.

Die Arbeit sollte auf das von Milojković entwickelte neuartige Verfahren der Hitzeschock-Behandlung von Vollblut und dessen Überführung in Zell-desintegriertes Blut (Cell-disintegrated Blood, CDB) aufbauen [7]. Ausgearbeitet werden sollte ein vollautomatisches on-line SPE-LC-MS/MS Verfahren mit integrierter thermischer Probenprozessierung. In diesem Zusammenhang sollte zunächst die Matrix CDB durch mikroskopische Verfahren näher charakterisiert werden. Bezüglich der Robustheit des Analysenverfahrens sollte insbesondere die Belastbarkeit der thermischen Prozessierungseinheit untersucht und ein Reinigungsverfahren entwickelt werden. Da bei der Transformation von Vollblut in CDB sämtliches Hämoglobin „freigesetzt“ wird, sollte eingehend untersucht werden, in wieweit diese zusätzliche Matrixfraktion abgereichert werden kann.

Schwerpunktmäßig sollte die extraktive Aufbereitung der neuartigen Matrix CDB optimiert und in die Plattform integriert werden. Dabei sollte eine multidimensionale Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) in Anlehnung an Georgi angewendet werden [8]. Ziel war es, eine selektive Abreicherung der hoch- und niedermolekularen CDB Matrix in dem Maße zu erreichen, dass der negative Elektrospray-Ionisationsprozeß im Tandem-Massenspektrometer nicht gestört wird. Insbesondere galt es interferierende Phospholipide zu entfernen bzw. von den Zielanalyten abzutrennen. In diesem Zusammenhang sollte zusätzlich ein neuartiges Verfahren zur Optimierung von HPLC-Trennungen, die Phasen-optimierte Flüssigkeits-Chromatographie (POPLC), erstmalig angewendet werden.

Das vollständige Analysenverfahren sollte abschließend validiert und mit derzeit verwendeten Methoden, wie Proteinpräzipitation der Vollblutmatrix und getrocknete Blutflecken (Dried Blood Spots, DBS) verglichen werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten für die LC-MS/MS Analyse

In der Literatur wird die Probenaufbereitung bei der Analyse von Stoffen aus komplexen biologischen Flüssigkeiten als schwierigster oder auch als Schlüsselschritt für eine erfolgreiche Analyse beschrieben [7-9]. Häufig sind die Zielanalyte nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und müssen gegebenenfalls angereichert werden. Erschwerend kommt hinzu, dass zahlreiche endogene Bestandteile mit der Analyse interferieren können. Viele Arzneistoffe sind zudem sehr stark an Proteine gebunden. Diese Tatsache beeinträchtigt die Analyse erheblich. Proteine können präzipitieren und denaturieren. Des Weiteren können sie am Extraktionsmaterial adsorbieren und führen infolgedessen zu erhöhtem Rückdruck, zu veränderten Retentionszeiten und zu verminderter Säuleneffizienz [9].

2.1.1 Biologische Flüssigkeiten

Biologische Flüssigkeiten sind Flüssigkeiten biologischen Ursprungs. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit körpereigenen Flüssigkeiten, d.h. Vollblut und Plasma bzw. Serum, gearbeitet. Unter allen biologischen Flüssigkeiten ist Vollblut von größtem analytischem Interesse. Es ist das wichtigste Transportmedium im menschlichen Körper. Die Blutspiegel der meisten therapeutischen und diagnostischen Substanzen korrelieren mit ihrer Wirkung bzw. diagnostischen Aussagekraft [1].

2.1.1.1 Blut, Plasma und Serum

Blut

Blut stellt aus funktioneller Sicht ein „flüssiges Gewebe/Organ“ dar. Es besteht aus Zellen und einer eiweiß- sowie elektrolythaltigen Flüssigkeit, dem Plasma. Alle zellulären Bestandteile des Blutes entstehen aus gemeinsamen Vorläuferzellen, den sogenannten pluripotenten Stammzellen [10].

Die Hauptaufgabe des Blutes ist der Stofftransport. Daraus ergeben sich weitere Aufgaben wie die Aufrechterhaltung der Homöostase, die Pufferwirkung, die Wärmeregulation und die Abwehrfunktion [11]. Die Gesamtblutmenge beträgt 6-8% des Körpergewichtes. Erwachsene haben demnach ein Blutvolumen von 4-6 Litern.

Blut besteht zu etwa 44% aus zellulären Elementen. Sie sind in Abbildung 1 dargestellt.

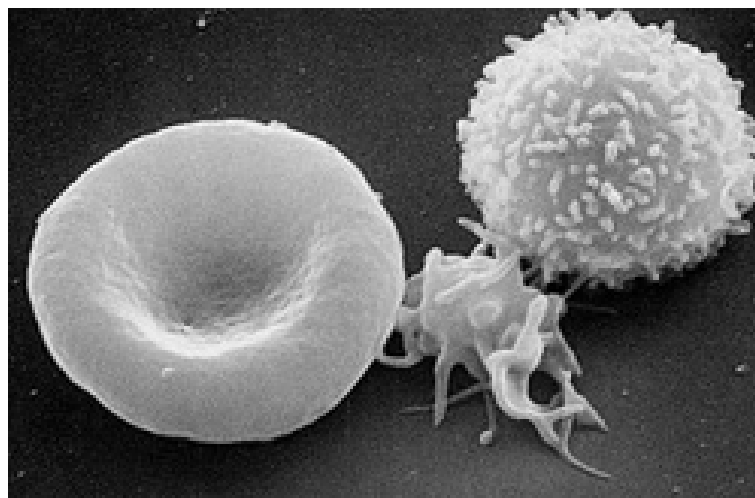


Abbildung 1: Blutzellen unter einem Rasterelektronenmikroskop (von links nach rechts: Erythrozyt, Thrombozyt und Leukozyt) [12].

Den mengenmäßig weitaus größten Teil bilden die roten Blutkörperchen (Erythrozyten). Der Volumenanteil der Erythrozyten am Gesamtvolumen wird als Hämatokrit bezeichnet. Erythrozyten bilden volumenmäßig mit über 99% den größten Teil der Zellen. Neben Wasser ist der Blutfarbstoff Hämoglobin mit 760g Hauptinhaltsstoff der Erythrozyten [13-14]. Die Erythrozyten sind kernlos und haben im reifen Zustand einen Durchmesser von 7-8µm. Sie haben eine bikonkave Form. Durch die im Vergleich zur Kugelform vergrößerte Oberfläche können sie leichter deformiert werden [11].

Die Leukozyten werden nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten und ihrem Bildungsort in weitere Gruppen unterteilt: Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Ihre Anzahl ist nicht so konstant und schwankt je nach Tageszeit und dem Funktionszustand des Organismus. Der Durchschnittswert liegt bei 6.000/ μL [10].

Thrombozyten sind mit einer Größe von 1-3 μm die kleinsten Zellen. Ihre Zahl im menschlichen Blut liegt zwischen 160.000-300.000/ μL . Wie die Erythrozyten besitzen auch sie keinen Kern. Wichtige Blutbildparameter eines Erwachsenen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Blutbildparameter eines Erwachsenen [13].

| Parameter | | Normalwert (-bereich) | Einheit |
|--|-------------|-----------------------|--------------------|
| Erythrozyten | ♀ | 4,80 (4,00 - 5,20) | $10^{12}/\text{L}$ |
| | ♂ | 5,30 (4,60 - 5,90) | $10^{12}/\text{L}$ |
| Retikulozyten | | 0,10 (0,05 - 0,20) | $10^{12}/\text{L}$ |
| Hämatokrit | ♀ | 0,42 (0,37 - 0,47) | |
| | ♂ | 0,47 (0,40 - 0,54) | |
| Hämoglobin | ♀ | 140 (120 - 169) | g/L |
| | ♂ | 160 (140 - 180) | g/L |
| mittleres korpuskuläres Volumen, MCV (mean corpuscular volume) | | 85 (80 - 96) | fL |
| mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt, MCH (mean corpuscular hemoglobin) | | 30 (27 - 34) | pg |
| mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration, MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) | | 340 (300 - 360) | g/L |
| Leukozyten | | 7 (4 - 10) | $10^9/\text{L}$ |
| Granulozyten | | 4,40 ((2,50 - 7,50) | $10^9/\text{L}$ |
| | Neutrophile | 4,20 (2,50 - 7,50) | $10^9/\text{L}$ |
| | Eosinophile | 0,20 (0,04 - 0,40) | $10^9/\text{L}$ |
| | Basophile | 0,04 (0,01 - 0,10) | $10^9/\text{L}$ |
| Monozyten | | 0,50 (0,20 - 0,80) | $10^9/\text{L}$ |
| Lymphozyten | | 2,20 (1,50 - 3,50) | $10^9/\text{L}$ |
| Thrombozyten | | 250 (150 - 400) | $10^9/\text{L}$ |

Blutanalysen haben in der klinischen Diagnostik eine große Bedeutung. Seine Zusammensetzung und seine Eigenschaften sind bei vielen Erkrankungen in typischer Weise verändert [13]. Bei Autoimmunreaktionen kommt es beispielsweise zu einem Erythrozytenverlust aufgrund einer gesteigerten Hämolyse [13]. Referenz-Hämatokritwerte zeigt Tabelle 2.

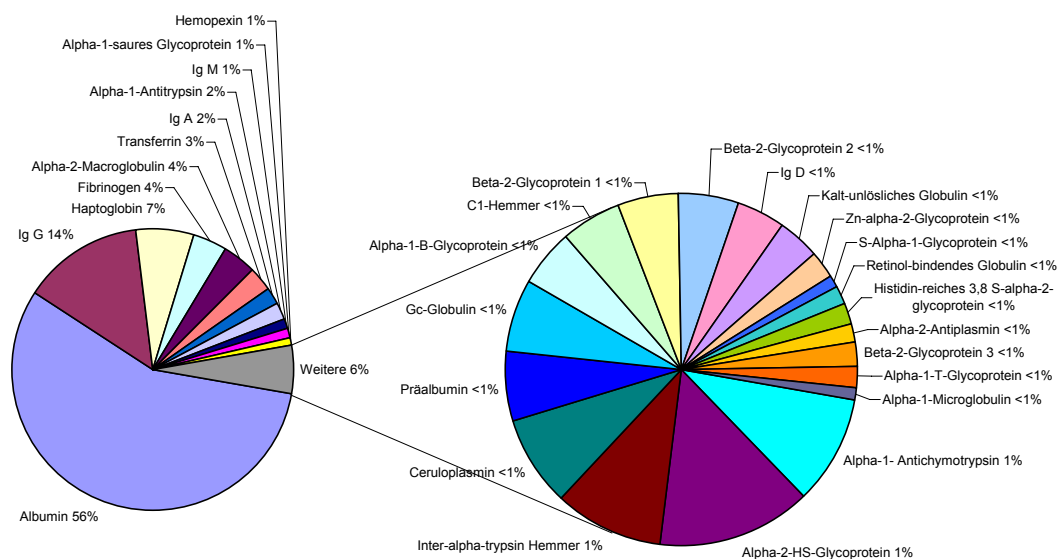
Tabelle 2: Referenz-Hämatokritwerte für verschiedene Entwicklungsstadien des Menschen.

| Entwicklungsstadium | Alter | Hämatokritwert |
|----------------------|----------------|----------------|
| Neugeborene | 1. - 4. Tag | 0,52 - 0,68 |
| Säuglinge | 1. - 2. Woche | 0,47 - 0,63 |
| | 2. - 4. Woche | 0,38 - 0,51 |
| | 4. - 12. Woche | 0,30 - 0,38 |
| Säuglinge und Kinder | > 12. Woche | 0,31 - 0,40 |
| Frauen | | 0,35 - 0,47 |
| Männer | | 0,40 - 0,52 |

Plasma

Blutplasma ist der flüssige Anteil des Blutes. Es besteht zu über 90% aus Wasser, zu 7-8% aus Eiweiß und zu ca. 2% aus niedermolekularen Substanzen (Salze, Kohlenhydrate, Lipide, Aminosäuren etc.).

Unter den im Blutplasma gelösten Substanzen überwiegen mengenmäßig die Plasmaproteine. Eine Übersicht der mengenmäßig größeren Plasmaproteinbestandteile zeigt Abbildung 2:

**Abbildung 2: Plasmaproteine und ihr prozentualer Anteil am Gesamtplasmaproteins [14].**

Die Gesamtproteinkonzentration des Plasmas liegt normalerweise zwischen 65 und 80g/L. Das Plasmaprotein stellt ein Gemisch aus tausenden unterschiedlichen Eiweißkörpern dar. Etwa 50% der Plasmaproteine entfallen auf die Albuminfraktion. Mit 69kDa gehört es zu den kleinsten Plasmaeiweißkörpern [10]. Plasmaproteine besitzen eine große Oberfläche mit zahlreichen hydro- und lipophilen Bindungsstellen. Daher dienen sie auch für viele Arzneimittel als Vehikel [13].

Unter den im Plasma transportierten Nährstoffen überwiegen die Lipide. Von allen Bestandteilen des Plasmas, ist die Gruppe der Lipide die variabelste. Sie haben einen mengenmäßigen Anteil von 3-9g/L. Sowohl die Art als auch die Menge schwanken innerhalb eines jeden Individuums. Diese Variabilität ist vom Nahrungszustand und der Metabolisierungsrate abhängig. Etwa 80% der Lipide liegen als Glyzeride, Phospholipide und Cholesterinester an Globulin gebunden vor (Lipoproteine) [13]. Phosphoglyceride enthalten neben Glycerin zwei veresterte Fettsäuren, Phosphorsäure oder Phosphoethanolamin, Lecithin, Phosphoserin, Phosphoinosit, etc.. Ihr Anteil an den Serumlipiden beträgt ca. 30% [15]. Das mit 70% mengenmäßig am häufigsten vorkommende Phospholipid ist das Phosphatidylcholin (Lecithin) [16]. Es ist ein Zwitterion. Eine Übersicht der im Plasma am häufigsten vorkommenden Phospholipidgruppen gibt Tabelle 3:

Tabelle 3: Phospholipide im Plasma und in den Erythrozyten [14].

| | Plasma | | | Erythrozyt | | |
|-------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------|
| | Durchschnitt [μmol/L] | SD [μmol/L] | relativer Anteil [%] | Durchschnitt [μmol/L] | SD [μmol/L] | relativer Anteil [%] |
| Phosphatidylethanolamin | 25 | 3 | 1,1 - 1,4 | 351 | 32 | 8,2 - 9,8 |
| Phosphatidylcholin | 1432 | 180 | 60,7 - 78,2 | 1472 | 66 | 36,0 - 39,4 |
| Plasmalogens | 83 | 11 | 3,5 - 4,6 | 415 | 45 | 9,5 - 11,8 |
| Sphingomyelin | 298 | 24 | 13,3 - 15,6 | 679 | 37 | 16,4 - 18,3 |
| Phosphatidylserin | 11 | 3 | 0,4 - 0,7 | 182 | 13 | 4,3 - 5,0 |
| Phosphorsäure | 9 | 0,8 | 0,4 - 0,5 | 156 | 8 | 3,8 - 4,2 |
| Phosphatidylinositol | 61 | 5 | 2,7 - 3,2 | 175 | 29 | 3,7 - 5,2 |
| Phosphatidylglycerol | 30 | 3 | 1,3 - 1,6 | 103 | 5 | 2,5 - 2,8 |
| Cardiolipin | 21 | 3 | 0,9 - 1,2 | 71 | 8 | 1,6 - 2,0 |
| Alkylether | 32 | 5 | 1,3 - 1,8 | 149 | 13 | 3,5 - 4,1 |
| Unbekannt | 39 | 8 | 1,5 - 2,3 | 73 | 12 | 1,6 - 2,2 |

Die ionische Zusammensetzung des Plasmas, hinsichtlich Kationen und Anionen, entspricht weitgehend der interstitiellen Flüssigkeit. Natrium- und Chloridionen sind die im Plasma mengenmäßig dominierenden Elektrolyte.

Blutserum

Serum ist der flüssige Bestandteil einer Blutprobe, in der nach Blutabnahme die Gerinnung vollständig abgelaufen ist. Blutserum unterscheidet sich vom Plasma dadurch, dass der Gerinnungsfaktor Fibrinogen fehlt [11].

2.1.1.2 Zell-desintegriertes Blut (Cell-disintegrated Blood, CDB)

Zell-desintegriertes Blut ist eine neue biologische Matrix [2-4, 7]. Sie entsteht durch Hitzeschockbehandlung von nativem Vollblut. Vollblut ist unter normalen Bedingungen eine heterogene, durch Zellen opak erscheinende dunkelrote Suspension. Unter bestimmten Bedingungen (Temperatur und Heizdauer) kann Vollblut in CDB umgewandelt werden. CDB ist eine klare, homogene, leuchtend rote Flüssigkeit, die nahezu frei von zellulären Bestandteilen ist.

Durch die Desintegration werden die Zellmembranen zerstört und intrazelluläre Bestandteile freigegeben. Auf diese Weise können auch intrazellulär gebundene Wirkstoffe aus den Zellen freigesetzt werden. Dieses neuartige Verfahren ermöglicht eine effiziente Analyse für Zellgebundene Wirkstoffe, bzw. für Wirkstoffe die ihren Wirkort in Blutzellen haben. Die Transformation von Vollblut in CDB ist auch anwendbar, wenn nur geringe Probenvolumina zur Verfügung stehen (beispielsweise in der Pädiatrie oder in Kleintierstudien) oder eine native Blutprobe schwer zugänglich ist (beispielsweise in der Forensik) [1]. Einen weiteren Nutzen gewinnt diese Methode durch die vollständige Automatisierbarkeit. Vorteil dieses Verfahrens ist darüber hinaus, dass es in einfacher Weise über eine beheizte HPLC-Edelstahlkapillare in einen automatischen Probengeber zu implementieren ist (in-line Verfahren).

Die Ermittlung und Charakterisierung der Prozessparameter bei der Herstellung und Verwendung dieser neuen biologischen Matrix im Rahmen der Therapeutischen Arzneimittelkontrolle (TDM) wurden bereits beschrieben [7].

2.1.2 Sekundäre Matrixbestandteile in Vollblut

Durch die Probenaufbereitung von Vollblut werden die in ihm enthaltenen Zellen meistens in einen unnatürlichen Stresszustand versetzt. Daher wird bei der Probenaufbereitung von Vollblut die Bildung von sekundären Matrixbestandteilen gefördert. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

2.1.2.1 „Ghosts“

Als „Ghosts“ werden post-hämolytische Zellreste roter Blutkörperchen bezeichnet. Sie bestehen hauptsächlich aus ihrer Zellmembran und sind weitgehend frei von intrazellulären Bestandteilen. „Weiße Ghosts“ sind frei von Hämoglobin [17-18]. Zusammensetzung, Eigenschaften, Form und Aussehen werden durch ihre Entstehung geprägt [19-21].

Durch ihre geringe Membrandicke wirken sie grazil (50-150Å im Trockenzustand). In diesem Zustand vermögen sie Wasser bis zu einer Membrandicke von 5000Å zu speichern [22]. Sie sind scheibenförmig und können die bikonkave Struktur von Erythrozyten zurück gewinnen. Ihre Größe und Form entsprechen in etwa denen der Erythrozyten [23]. Sie entstehen durch hypotone Lyse, Dialyse, elektrische Hämolyse, durch Saponinzusatz, durch Einfrieren und Auftauen, durch Scherbeanspruchung, durch Ultraschall oder durch Hitzezufuhr [18, 20, 24-28]. Demnach gibt es verschiedene Typen von „Ghosts“ [29]. Eine Lösung aus „Erythrozyten-Ghosts“ ist eine heterogene Mischung [30].

2.1.2.2 Mikropartikel

Mikropartikel wurden 1967 zum ersten Mal in humanem Plasma als Membranfragmente, die von Thrombozyten freigesetzt werden, beschrieben. Mikropartikel sind daher kleine Membranvesikel [31].

Die Mehrheit, der im Blut vorkommenden Mikropartikel entstammen Thrombozyten [32]. Jedoch können sie von einer Vielzahl verschiedener Zellen, u.a. auch Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, freigesetzt werden. Sie tragen sowohl Membranbestandteile als auch zytoplasmatische Elemente der Ursprungszelle. Ihre Größe variiert je nach zellulärer Herkunft von 0,05-1,5µm [33].

Bei Erythrozyten kommt es durch unnatürliche Bedingungen, wie beispielsweise durch den Entzug von ATP, durch eine Spektrinaussetzung oder durch Interkalation von Amphiphaten wie Dimyristoylphosphatidylcholin in die äußere Faltung der Membrandoppelschicht zur Mikrovesikelfreisetzung [34-37]. Des Weiteren führen Zellalterung, einige Krankheiten und der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zur Freisetzung von Membranvesikeln [34, 38-42]. Dieser Anstieg kann u.a. durch mechanischen Stress hervorgerufen werden [43].

Mikropartikel entstehen durch eine geordnete Umstrukturierung der Membran, durch einen Membran-Abschnürungs-Prozess. Durch ihren geordneten Aufbau mit integrierten Oberflächenproteinen besitzen sie zusätzlich interzelluläre Signal- und Kommunikationsfunktionen [44-45]. Diese wiederum spielen bei Krankheiten eine wichtige Rolle [40]. Die Freisetzung von Mikropartikeln ist nicht automatisch mit dem Zelltod verbunden.

Die herausragende Eigenschaft der Mikropartikel ist ihre prokoagulierende Aktivität über die Aktivierung von Blutplättchen oder Endothelzellen [39, 46].

2.1.2.3 Subzelluläre Partikel

Fragmente von Erythrozyten entstehen durch Membranknospung [44, 47]. Fragmentation ist der Verlust eines Membranstückes einer Zelle, der Hämoglobin enthält, aber nicht enthalten muss [48].

Bei einer thermisch induzierten Hämolyse kommt es mit zunehmender Temperatur zur Mikrovesikulierung der Erythrozyten mit Bildung zahlreicher sphärischer ungleichgroßer Zellbruchstücke. Gleichzeitig unterliegen die Erythrozyten einer erhöhten osmotischen Zerbrechlichkeit [49]. Ab 50°C zerbrechen die bereits stark an Membrandicke reduzierten Erythrozyten bzw. „Ghosts“ in kleine Vesikel [49-50], die subzelluläre Partikel genannt werden. Begründet wird dies durch die Inaktivierung von Vitalenzymen und mit der Denaturierung des Strukturproteins Spektrin [51]. Weitere Erklärungen basieren auf der Bildung von lytischen Agentien im Plasma und auf dem Schmelzen der Lipoproteine in den Membranen [28]. Bei 55°C kommt es zur Denaturierung der Membranproteine und des Cytoplasmas [52]. Die Denaturierung von Hämoglobin findet erst zwischen 66-74°C statt [52]. Mikrovesikulation erfolgt bei Temperaturen über 70°C und ist abhängig von der Heizdauer und von zusätzlichem mechanischen Stress der Probe [53].

2.1.3 Anforderungen an die Probenaufbereitung

Die Zielanalyte müssen vor einer chromatographischen Analyse von ihrer biologischen Matrix abgetrennt werden. Proteine oder andere Makromoleküle, wie Kohlenhydrate und Nukleinsäuren, aber auch niedermolekulare Substanzen, wie beispielsweise Salze und andere endogene Verbindungen, können durch entsprechende Probenaufbereitung entfernt werden. Somit können Interferenzen bei der Detektion und unerwünschte Wechselwirkungen bei der Extraktion und bei der chromatographischen Trennung minimiert werden. Darüber hinaus kann die analytische Säule durch nicht abgetrennte Matrixbestandteile schnell verstopfen oder inaktiviert werden. Durch eine gute Probenaufbereitung wird nicht nur das Verstopfen der

Kapillaren vermieden, sondern gleichzeitig die Selektivität, die Sensitivität und die Zuverlässigkeit der Analyse verbessert.

Für die HPLC ist eine gute Probenaufbereitung essentiell. Die Probenaufbereitung kann gegebenenfalls sogar der limitierende Faktor für eine gute Analyse sein [54]. Beispielsweise können die Analyte stark aufkonzentriert werden, sodass sie im Detektionsbereich des Detektors liegen. Gleichzeitig wird durch die Probenaufbereitung die Spezifität durch Abtrennung von störenden Substanzen erhöht. Ein wichtiges Ziel der Probenaufbereitung ist auch, die Analyte von Matrixsubstanzen zu befreien, die mit der HPLC-Säule inkompatibel sind [55]. Eine angemessene Probenaufbereitung kombiniert mit einer effektiven Chromatographie führt daher zu den besten Ergebnissen für eine LC-MS/MS-Analyse [56].

Die Effektivität eines Probenaufbereitungsverfahrens hängt von der Vollständigkeit der Proteinentfernung ab. Plasma, Serum und Vollblut müssen daher in einem entsprechenden Extraktionsverfahren einer Hämolyse- und/oder einem Proteinpräzipitationsschritt unterzogen werden [1]. Eine gute Probenaufbereitung muss reproduzierbar sein und zu wenig Probenverlust führen. Sie sollte schnell und kostengünstig sein [1], vor allem bei einer Anwendung im klinischen-chemischen Routinebetriebs.

2.1.4 Verfahren für die Probenaufbereitung

Die Aufbereitung biologischer Flüssigkeiten für die Analyse der in ihr enthaltenen Pharmaka beinhalten folgende Schritte:

- Freisetzung des Wirkstoffes aus seiner Matrix,
- Entfernung möglichst aller die Analyse störenden Verbindungen,
- Aufkonzentrierung der Zielanalyte (nicht immer erforderlich),
- Anpassung des Probenlösemittels an die mobile Phase des Trennsystems

Die gebräuchlichsten Methoden sind die Proteinpräzipitation mit Säuren oder organischen Lösemitteln, die Flüssig-Flüssig Extraktion und die Festphasenextraktion (Solid Phase

Extraction, SPE). Durch die Automatisierbarkeit wird die SPE aktuell am häufigsten angewendet. Weitere Methoden sind Dialyse, Membranfiltration und getrocknete Blutflecken.

2.1.4.1 Proteinpräzipitation

Die Proteinpräzipitation ist ein gängiges Probenaufbereitungsverfahren in der LC-MS Analyse von Pharmaka in biologischen Flüssigkeiten [43-45]. Es wird häufig zur Entfernung von Proteinen und zur Freisetzung des Analyten aus Proteinbindungen genutzt.

Dafür gibt es vier verschiedene Reagenzien: organische Lösemittel, Säuren, Salze und Metallionen. Die Präzipitation von Proteinen resultiert aus der Reduzierung von polaren Interaktionen des Proteins mit dem wässrigen Lösemittel, aus ionischen Interaktionen mit Salzen und abstoßenden elektrostatischen Kräften. Dabei erniedrigen organische Lösemittel die Dielektrizitätskonstante der Plasmaproteine, was zu stärkeren elektrostatischen Wechselwirkungen führt. Gleichzeitig verdrängen organische Lösemittel Wassermoleküle aus der Hydrathülle. Dadurch werden hydrophobe Protein-Proteinreaktionen unterdrückt, während elektrostatische Interaktionen überwiegen und zur Proteinaggregation führen. Säuren erniedrigen den pH-Wert und bilden unlösliche Salze mit den positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bei pH-Werten unter deren isoelektrischem Punkt. Die Salzionen werden hydratisiert. Dabei entziehen sie der Proteinoberfläche Wassermoleküle. Dadurch kommt es vermehrt zu Protein-Protein-Interaktionen und damit zur Proteinpräzipitation. Positiv geladene Metallionen reduzieren die Proteinlöslichkeit durch Veränderung des isoelektrischen Punktes. Sie konkurrieren mit Protonen in der Lösung um die Bindung an Aminosäuren. Da jedoch die Metallionen stärkere Bindungskräfte besitzen, sinkt der pH-Wert der Lösung. Die Kombination aus verringertem isoelektrischem Punkt und dem erniedrigten pH-Wert führt zur Proteinpräzipitation [57].

Ein entscheidender Nachteil dieser sehr schnellen Methode ist, dass nicht alle Plasmaproteine präzipitieren. Häufig wird der Überstand ohne weitere Aufreinigung in ein HPLC System injiziert und führt deshalb zu einer verminderten Trennleistung bzw. dem Aufbau von Gegendruck. Auch werden endogene Substanzen, wie beispielsweise Phospholipide, nicht

abgetrennt. Dies führt zu stark ausgeprägten Matrixeffekten bei der MS-Detektion. Durch die ineffiziente Proteinpräzipitation kommt es darüber hinaus zu einem relativ hohen Hintergrundsignal im Chromatogramm durch Verunreinigungen [58]. Die relative Effizienz verschiedener Reagenzien für die Proteinpräzipitationsreagenzien ist in [59] beschrieben.

2.1.4.2 Flüssig-Flüssig Extraktion (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Bei der Flüssig-Flüssig Extraktion wird ein wässriges Lösemittel mit einem organischen Lösemittel gemischt. Dabei kommt es zu Interaktionen an der Phasengrenze. Der Analyt kann so von der wässrigen in die organische Phase wechseln.

Diese Methode produziert sehr reine Extrakte und der Analyt kann sehr gut aufkonzentriert werden. Der Verlust des Analyten durch Proben transfer und Emulsionformation ist jedoch nicht zu vernachlässigen. Problematisch ist auch die Adsorption des Analyten an der Oberfläche des Schütteltrichters. Größere Nachteile dieser Methode sind jedoch, dass die richtige Lösemittelwahl sehr zeitaufwendig sein kann, und dass das Verfahren schlecht automatisierbar ist. Bis in die 1980er Jahre hatte dieses Verfahren weitaus mehr Bedeutung.

2.1.4.3 Hämolyse

Als Hämolyse wird der Abbau von Erythrozyten bezeichnet [60]. Dabei kommt es zur Auflösung von Erythrozyten durch Zerstörung der Zellmembran mit Übertritt von Hämoglobin in das Plasma. Hämolyse entsteht durch Substanzen, die die Bestandteile der Zellmembran angreifen, z.B. oberflächenaktive Substanzen, Gifte oder lysierende Antikörper. Sie ist aber auch durch einen übermäßigen osmotischen Wassereinstrom möglich. Nach osmotischer Hämolyse bleibt von den Erythrozyten nur die Zellmembran übrig, die sich wieder nahtlos verschließen kann. Diese Membranhüllen werden dann auch als „Ghosts“

bezeichnet (siehe Kapitel 2.1.2.1). Darüber hinaus können auch mechanische Einflüsse Ursache von Hämolyse sein [11].

In der Probenaufbereitung wird eine Hämolyse häufig bewusst verursacht. Eine reine Hämolyse kann durch folgende Verfahren hervorgerufen werden:

- durch Gefrieren der Probe unter 20°C und anschließendes Auftauen der Probe,
- durch thermische Schädigung,
- durch Ultraschall,
- durch osmotischen Schock.

Andere Verfahren, wie beispielsweise eine mechanische Membranzerstörung und der Gebrauch von Enzymen, sind in der Vollblutanalyse eher selten [1].

2.1.4.4 Getrocknete Blutflecken (Dried Blood Spots, DBS)

Die Analyse von Substanzen aus getrockneten Blutflecken ist ein gebräuchliches Verfahren im Neugeborenenenscreening [61-63]. Dafür wird das Blut im Normalfall aus der Ferse entnommen. Mit ihm sind die markierten Felder eines speziellen Filterpapiers vollständig zu bedecken. Nach mehrstündigem Trocknen erfolgt die Anfertigung von Stanzlingen aus den gekennzeichneten Bereichen des Filterpapiers. Bevor die Analyte einer weiteren Analyse unterzogen werden können, müssen sie aus den Stanzlingen extrahiert werden.

Ein neuerer Anwendungsbereich der DBS-Analyse ist das Therapeutischen Drug Monitoring [64-67]. Hierfür wird Kapillarblut entnommen und ein definiertes Volumen auf das Filterpapier pipettiert. Vorteile der DBS-Analyse sind die gesteigerte Patientenzugänglichkeit und die lange Haltbarkeit der getrockneten Blutflecke bei Raumtemperatur. Nachteilig ist, dass die nachfolgende Probenaufbereitung schwierig zu automatisieren ist. Problematisch ist u.a. auch die Zugabe des Internen Standards.

2.1.4.5 Hitzeschockbehandlung

Bei der Hitzeschockbehandlung handelt es sich um ein neuartiges Verfahren zur Probenaufbereitung [2-3]. Durch definiertes Erhitzen einer Vollblutprobe kommt es zur Desintegration von zellulären Blutbestandteilen, ohne dass die in der Probe enthaltenen Proteine denaturieren oder präzipitieren [7]. Dabei wird die durch Zellbestandteile opak wirkende, heterogene Flüssigkeit in eine homogene klare Flüssigkeit umgewandelt, die frei von zellulären Bestandteilen ist (Zell-desintegriertes Blut, CDB). Dadurch besteht erstmalig die Möglichkeit, die Aufbereitung von Vollblutproben vollständig zu automatisieren. Dies kann z.B. mittels der nachfolgend beschriebenen Festphasenextraktion umgesetzt werden.

2.1.4.6 Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE)

Als Festphasenextraktion wird eine spezielle Variante der säulenchromatographischen Probenaufreinigungsmethode bezeichnet, die in einer Anreicherung, Aufkonzentrierung oder Isolation eines Analyten resultiert. Dabei handelt es sich um einen physikalischen Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase (Sorbens) stattfindet. Sie stellt eine vereinfachte und miniaturisierte flüssigchromatographische Trennung mit stufenweiser Elution dar [68].

Die Festphasenextraktion gewann seit Ende der 1970er Jahre aufgrund ihrer guten Automatisierbarkeit zunehmend an Bedeutung und ist mittlerweile die am meisten verwendete Methode in der bioanalytischen HPLC. Die SPE hat gegenüber der lange vorherrschenden LLE durch den geringeren Lösemittelverbrauch und die besseren Aufreinigungsmöglichkeiten stark an Attraktivität gewonnen [69]. Die korrekte Auswahl der chromatographischen Adsorbentien ist dabei essentiell.

Weitere Nachteile dieses Verfahrens konnten durch die Entwicklung neuerer Materialien überwunden werden. So sind die Materialien heute über einen weiten pH-Bereich stabil und die Sorbentien unterliegen kaum noch Volumenschwankungen. Sie besitzen ein verbessertes Extraktionsvermögen, insbesondere auch für polarere Substanzen und eine höhere Kapazität

(Retentionsvermögen). Darüber hinaus sind neuere Materialien auch ohne Konditionierungsschritt einsatzbereit [69].

Für die direkte Aufgabe und Extraktion von biologischen Flüssigkeiten werden spezielle SPE-Packungsmaterialien verwendet (siehe Kapitel 2.2.1.4).

2.2 Methodenentwicklung in der Bioanalytik

Eine bioanalytische Methode besteht aus folgenden Schritten: Probenentnahme, Probenaufbereitung (Aufreinigung und/oder Aufkonzentrierung), Injektion der Probe in das System, (Derivatisierung), Trennung, Detektion, Quantifizierung und Datenprozessierung. Dabei sind meistens die Probenaufbereitung und die chromatographische Trennung die zeitaufwendigsten Schritte [70]. Die Methodenentwicklung ist von den Eigenschaften der Zielanalyte, von deren therapeutischen Konzentrationen, von der Beschaffenheit der Matrix, vom Trennmechanismus und vom Detektionsmodus abhängig [69].

2.2.1 Methodenentwicklung in der Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung ist einer der wichtigsten Schritte einer bioanalytischen Methode. Um Robustheit und eine hohe Sensitivität sowie Selektivität zu garantieren, sollten Interferenzen vor der analytischen Trennung eliminiert werden [70]. In der Aufbereitung komplexer biologischer Flüssigkeiten liegt die Herausforderung deswegen darin, die zahlreichen nieder- und hochmolekularen Matrixbestandteilen abzureichern und simultan die Zielanalyte zu extrahieren bzw. anzureichern. Es gilt, Sorbentien unterschiedlicher Trennmechanismen so auszuwählen, dass mit ihnen vor allem die störenden Matrixeffekte eliminiert werden können. Die Konditionen müssen so gewählt und eingestellt werden, dass sie zum einen eine

Retention bzw. Elution der Zielanalyte, zum anderen aber auch eine Automatisierbarkeit der Analyse zulassen.

2.2.1.1 Automatisierung der Festphasenextraktion

Für die Probenaufbereitung stehen verschiedene Arbeitsweisen zur Auswahl. Diese werden in Abbildung 3 erläutert.

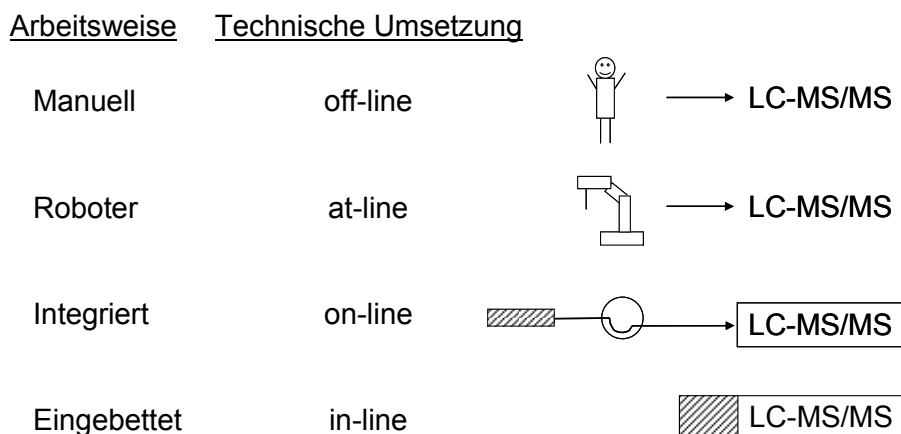


Abbildung 3: Arbeitsweisen und technische Umsetzungen. Probenaufbereitung und –prozessierung einer nativen biologischen Flüssigkeit für die LC-MS/MS Analyse [71].

Bezüglich der Festphasenextraktion ist die manuelle Arbeitsweise (off-line SPE) sehr arbeitsaufwendig und zeitintensiv. Der Einsatz von Robotern (at-line SPE) verkürzt die Probenaufbereitung erheblich. Die direkte Injektion einer biologischen Probe und integrierte Aufbereitung (on-line SPE) gelingt durch die Verwendung maßgeschneiderter SPE-Materialien [72] (siehe Kapitel 2.2.1.4). Dabei ist die SPE-Säule, direkt über eine Säulenschaltung an das Analysensystem gekoppelt. Bei einer integralen Arbeitsweise (in-line) ist neben der Aufreinigung der biologischen Probe auch deren Prozessierung in das Analysensystem implementiert.

Eine typische SPE-Sequenz besteht aus vier individuellen Schritten: Konditionieren des Sorbens, Applikation der Probe, Aufreinigung der Probe und Desorption der Zielanalyte [69].

Die Vorteile der automatisierten Festphasenextraktion sind ein hoher Probendurchsatz durch reduzierte manuelle Arbeit und eine gesteigerte analytische Qualität durch hohe Wiederfindungsraten der Analyte. Weiterhin ist die Reproduzierbarkeit des Extraktionsprozesses gut. Automation reduziert darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit an analytischen Fehlern [73]. Das Einsparen an Personal bedeutet gleichzeitig eine höhere Sicherheit im Labor. Das potentielle Kontaminationsrisiko mit infektiösem Material ist reduziert, und die Handhabung giftiger Lösemittel ist herabgesetzt. Es reichen sehr kleine Probenvolumina aus, um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen. Größter Nachteil sind Matrixeffekte [74].

2.2.1.2 Multidimensionale Chromatographie

Multidimensionale Chromatographie liegt vor, wenn mindestens zwei verschiedene, zueinander orthogonale (total unabhängige) Trennungsmechanismen angewandt werden [75]. Dabei werden eine oder mehrere Fraktionen von einem chromatographischen Medium (meist eine Säule) auf ein Zweites oder ein weiteres chromatographisches Medium (Säule/n) transferiert [76]. In der Chromatographie gibt es die in Tabelle 4 aufgeführten Modi.

Tabelle 4: Chromatographische Modi und Abkürzungen nach Giddings [77].

| klassische Modi | Abkürzung |
|---|--|
| Gas - Flüssigkeits - Chromatographie | Gas - liquid chromatography, GLC |
| Gas - Festphasen - Chromatographie | Gas - solid chromatography, GSC |
| Chromatographie mit superkritischer Flüssigkeit | Supercritical fluid chromatography, SFC |
| Umkehrphasen - Chromatographie | Reversed phase liquid chromatography, RPC |
| Normalphasen - Chromatographie | Normal phase liquid chromatography, NPC |
| Ionenaustausch - Chromatographie | Ion exchange liquid chromatography, IEC |
| Größenausschluss - Chromatographie | Size exclusion liquid chromatography, SEC |
| Gradienten - Elutions - Chromatographie | Gradient elution liquid chromatography, GEC |
| Dünnschicht Chromatographie | Thin layer liquid chromatography, TLC |
| neue Modi | Abkürzung |
| Hydrophile - Lipophile Interaktions - Chromatographie | Hydrophilic - lipophilic balance liquid chromatography, HLBC |
| Hydrophile Interaktionschromatographie | Hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC |

Von vollständiger Multidimensionaler Chromatographie wird gesprochen, wenn alle Bestandteile oder gleiche Anteile einer Probe allen Trennmechanismen unterliegen. Dabei muss die Trennung aus der ersten Dimension im Wesentlichen beibehalten werden.

Die bekannteste Version der multidimensionalen Chromatographie ist die zweidimensionale Chromatographie (2D). Sowohl in der Gas- als auch in der Flüssigkeitschromatographie dient sie zur Auftrennung komplexer Mischungen über zwei analytische Trennsäulen. Des Weiteren wird diese Methode in der Probenaufbereitung zur Abreicherung der Probenmatrix genutzt [76]. Wird diese zweidimensionale Chromatographie im Säulenmodus angewandt, wird dies auch als „Säulenschalten“ (column switching) bezeichnet [76]. Diese multidimensionale Trennung wurde von Huber 1973 zum ersten Mal beschrieben. Sie führte zu einer enormen Peakkapazitäts- und Selektivitätssteigerung [78]. Dabei werden bestimmte Fraktionen der Primärsäule selektiv auf eine oder mehrere Sekundärsäulen transferiert. Mit diesem Verfahren ist es sogar möglich, bestimmte Spurenanalyte anzureichern, die Auflösung eines Teils der komplexen Probe durch verschiedene Modi der stationären- und mobilen Phasen zu verbessern und die Durchsatzmenge durch sogenannte „heart cut“, „backflush“, „front-“, oder „end-cut“ und „recycle chromatography“ zu erhöhen.

Off-line 2D-Techniken gehören mittlerweile zu den Standardmethoden in heutigen Laboratorien. Dabei ist eine Automatisierung wegen der leichteren Handhabung sicherlich sehr interessant, jedoch nicht ganz einfach. Größter Nachteil dieser Methode ist, dass die Zielanalyte während der Trennung auf beiden chromatographischen Medien verdünnt werden. Dies führt ohne Zwischenaufkonzentrierung zu Sensitivitäts- und Auflösungsverlust [76].

Für die Aufbereitung von komplexen biologischen Flüssigkeiten ist diese Methode von größtem Interesse. 1997 zeigten Rudolphi et al., dass niedermolekulare Substanzen in biologischen Flüssigkeiten nach direkter Injektion von Plasma auf eine SPE-Säule mit eingeschränkter Zugänglichkeit (RAM) als erste Dimension, gekoppelt an eine C18 Umkehrphasen Säule als zweite Dimension, analysiert werden können [79]. 2006 konnten Georgi et al. erstmals eine ungestörte MS/MS Detektion nach direkter Injektion von Humanplasma mit Hilfe von multidimensionaler Probenaufbereitung erzielen [80].

2.2.1.3 Säulenschalten (column switching)

Unter Säulenschalten wird der Gebrauch von mindestens zwei Säulen bzw. Kartuschen verstanden, die durch Schaltventile miteinander verbunden sind, um eine höhere chromato-

graphische Auflösung oder eine effizientere Probenaufbereitung zu bewirken [41, 46]. In der bioanalytischen HPLC ist das Säulenschalten schon lange als effiziente Technik zur Trennung, Aufreinigung und Quantifizierung von Vielkomponentengemischen, d.h. von komplexen biologischen Flüssigkeiten bekannt [81].

Auch die on-line SPE (SPE-LC) wird zu den „column switching“-Methoden gezählt. Eine typische Säulenschaltung in der Probenaufbereitung besteht dabei aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird die Probe auf eine SPE-Säule aufgebracht und fraktioniert. Dabei werden die Zielanalyte aus der Probenmatrix extrahiert oder abgetrennt. Die Probenmatrix dagegen wird nicht reteniert und in den Abfall gespült. Der Transfer der Analyte von der SPE-Säule (Kartusche) auf die in Reihe geschaltete analytische Trennsäule stellt den zweiten Schritt dar. Der dritte Schritt stellt schließlich den eigentlichen analytischen Auftrennungsschritt dar [82].

In der vorliegenden Arbeit werden die Kenngrößen (t_A , t_M und t_T) aller untersuchten SPE-Materialien nach Major et al. bestimmt bzw. optimiert [82] (Abbildung 4). Die Vorgehensweise und Bestimmung dieser Kenngrößen für die Säulenschaltung werden im Folgenden kurz beschrieben.

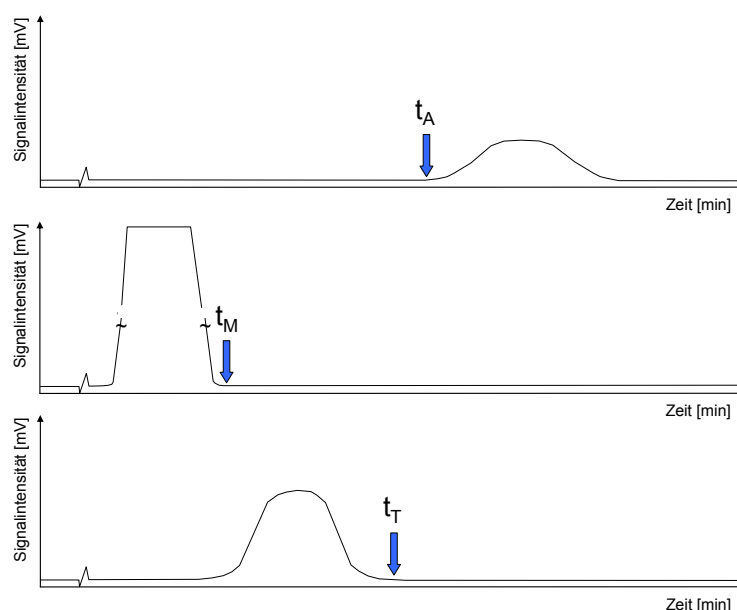


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Chromatogrammen für die Bestimmung der Durchbruchzeit (t_A), für die Bestimmung der Fraktionierungszeit (t_M) und für die Bestimmung der Transferzeit (t_T) nach [82].

Bestimmung der Durchbruchzeit (t_A) der Analyten

Für die Bestimmung der Durchbruchzeit wird der Detektor direkt hinter die in dieser Arbeit untersuchten SPE-Kartuschen angeschlossen. Es wird eine definierte Menge an Standardlösung injiziert. Die Zeit, bei welcher der Analyt zu eluieren beginnt, wird als Durchbruchzeit definiert.

Für eine vollständige Extraktion und Wiederfindung des Zielanalyten muss die Durchbruchzeit größer als die Fraktionierungszeit sein.

Bestimmung der Fraktionierungszeit (t_M) der Probenmatrix

Für die Bestimmung der Fraktionierungszeit entspricht der instrumentelle Aufbau dem der Bestimmung der Durchbruchzeit. Die Bestimmung erfolgt durch Injektion einer reinen Matrixprobe zu der Bestimmung der Durchbruchzeit identischen chromatographischen Bedingungen. Die Fraktionierungszeit (t_M) ist dabei definiert durch die Zeit, die benötigt wird um die Probenmatrix vollständig in den Abfall zu spülen.

Ist die zu fraktionierende Matrix Plasma oder CDB, kann beispielsweise im Absorptionsmaximum von Proteinen (280nm) die Elution der Matrix mit einem UV-Detektor vermessen werden. Bei CDB kann zusätzlich bei 430nm, dem Absorptionsmaximum von Hämoglobin gemessen werden.

Bestimmung der Transferzeit (t_T) der Analyten von der SPE-Kartusche

Der instrumentelle Aufbau entspricht dem der Bestimmung der Durchbruch- und dem der Fraktionierungszeit. Jedoch werden in der Regel andere chromatographische Bedingungen gewählt. Als Transferzeit wird die Zeit bezeichnet, die benötigt wird um die Analyte komplett von der SPE-Kartusche auf eine weitere Kartusche bzw. auf die analytische Säule zu transferieren.

Bestimmung der Ventilschaltzeiten

Ein Analysenzyklus wird durch Schaltimpulse der verschiedenen 6-Wege Ventile in Teilschritte unterteilt. Die Ventilschaltzeiten terminieren die zeitliche Abfolge der einzelnen Teilschritte. Sie können aus den ermittelten Kenngrößen t_A , t_M und t_T errechnet werden.

Die erste Ventilschaltung (t_{V1}) erfolgt nach der Fraktionierung und beendet damit den ersten Teilschritt des Analysenzyklus. Gleichzeitig beginnt mit ihr der zweite Teilschritt des Analysenzyklus, der Transferschritt der retenierten Fraktion auf eine zweite SPE-Kartusche/analytische Säule. t_{V1} berechnet sich aus t_M und einem Sicherheitszuschlag und ist in Abbildung 5 dargestellt:

$$t_{V1} [\text{min}] = t_M + X$$

X = Sicherheitszuschlag

Abbildung 5: Berechnung der Schaltzeiten eines Analysenzyklus: Ventilschaltzeit (t_{V1}).

Die zweite Ventilschaltung (t_{V2}) erfolgt demnach nach erfolgreichem Transferschritt. Sie leitet zur selben Zeit den dritten Teilschritt, die Elution von der zweiten SPE-Kartusche ein. T_{V2} berechnet sich aus t_T und einem Sicherheitszuschlag und ist in Abbildung 6 dargestellt:

$$t_{V2} [\text{min}] = t_T + X$$

X = Sicherheitszuschlag

Abbildung 6: Berechnung der Schaltzeiten eines Analysenzyklus: Ventilschaltzeit (t_{V2}).

2.2.1.4 SPE-Materialien

In der vorliegenden Arbeit wurden HySphere-Materialien der Firma Spark Holland und Oasis[®]-Materialien der Firma Waters im Kartuschenformat verwendet. Des Weiteren kamen verschiedene Bulkmaterialien anderer Firmen zur Anwendung, die in selbst gefertigte SPE-Säulen mit denselben Dimensionen gepackt wurden.

SPE-Materialien mit hydrophobem Interaktionsmechanismus

Das am häufigsten verwendete SPE-Material zur Extraktion/Retention von Pharmaka sind Materialien mit hydrophobem Interaktionsmechanismus [83]. Dabei kommen häufig an Silika gebundene Alkylverbindungen zum Einsatz, aber auch Copolymerverbindungen, wie beispielsweise quervernetztes Polystyren-Divinylbenzol oder hydrophil-lipophil balancierte Polymere sind gebräuchlich [84]. Nachteil dieser porösen Materialien ist jedoch die limitierte Selektivität. Der unspezifische Retentionsmechanismus hält nicht nur die hydrophoben Zielanalyte zurück, sondern auch hydrophobe Matrixbestandteile, die wiederum später zu Matrixeffekten führen können [85]. Die Parameter der genutzten HySphere Materialien sind in Abbildung 7 dargestellt:

| | | |
|---|--|--|
| $\text{—Si—CH}_2\text{—CH}_3$ | $\text{—Si—(CH}_2\text{)}_7\text{—CH}_3$ | $\text{—Si—(CH}_2\text{)}_{17}\text{—CH}_3$ |
| Spezifische Oberfläche : 168,2 m ² / g | Spezifische Oberfläche : 325 m ² / g | Spezifische Oberfläche : 440 m ² / g |
| Durchschnittlicher Porendurchmesser : 138 Å | Durchschnittlicher Porendurchmesser : 111 Å | Durchschnittlicher Porendurchmesser : 104 Å |
| Porenvolumen : 0,77 cc / g | Totales Porenvolumen : 0,90 cc / g | Totales Porenvolumen : 1,05 cc / g |
| Durchschnittlicher Partikeldurchmesser : 8,15 µm | Durchschnittlicher Partikeldurchmesser : 9,92 µm | Durchschnittlicher Partikeldurchmesser : 7,00 µm |
| Durchschnittlicher Sorbensinhalt : 18,30 mg | Durchschnittlicher Sorbensinhalt : 17,91 mg | Durchschnittlicher Sorbensinhalt : 18,09 mg |

Abbildung 7: Struktur und Spezifikationen von HySphere Sorbentien.

Der Extraktions- und Fraktionierungsmechanismus der hydrophil-lipophil balancierten Polymere ist in Abbildung 8 dargestellt:

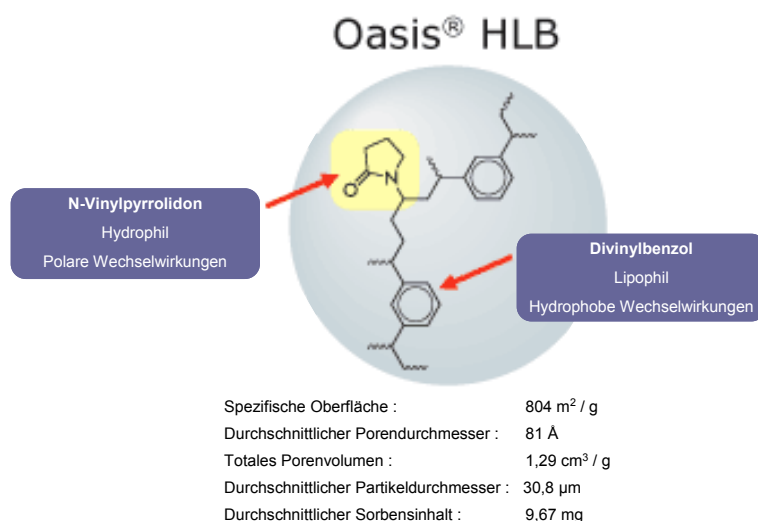


Abbildung 8: Extraktions- und Fraktionierungsmechanismus von hydrophil-lipophil balancierten Polymeren inklusive ihrer Spezifikationen [in Anlehnung an 86].

SPE-Materialien mit eingeschränkter Zugänglichkeit (Restricted Access Materialien, RAM)

Der Begriff „Restricted Access Materialien“ (RAM) wurde von Desilets et al. eingeführt [86-87]. RAM-Materialien sind spezielle maßgeschneiderte Adsorbentien. Sie besitzen eine definierte Porengröße. Damit ist die Zugänglichkeit für makromolekulare Probenbestandteile eingeschränkt. Aufgrund ihrer Größe ist es ihnen damit nicht möglich, zu den Adsorptionsstellen, die im Inneren des porösen Materials liegen, zu gelangen. Dieses Material besitzt im Partikelinneren einen Extraktionsmechanismus für niedermolekulare Substanzen, so dass Partikel mit einem geringen Molekularvolumen zurückgehalten werden [88]. Der Porendurchmesser und damit die Ausschlussbarriere beträgt 60Å. Der Größenausschluss liegt bei 15 kDa. Probenbestandteile mit einem größeren Molekulargewicht werden ausgeschlossen und eluieren im Totvolumen einer entsprechenden Säule. RAM-Materialien besitzen damit zwei Trennmechanismen. Das Größenausschlussprinzip wird entweder mit einem konventionellen hydrophoben Interaktionsmechanismus oder mit Ionenaustauschern kombiniert. Verschiedene Typen von RAM-Materialien wurden von Boos et al. zusammengefasst [89].

Vorteil der RAM-Materialien ist, dass sie eine direkte Injektion und Trennung unbehandelter biologischer Flüssigkeiten erlauben. Sie besitzen eine biokompatible Oberfläche, die es zulässt, zahlreiche proteinreiche Proben zu injizieren, ohne dass chromatographische Eigenschaften verloren gehen [81, 90].

In der vorliegenden Arbeit wurde das RAM Adsorbens LiChrospher[®] ADS der Firma Merck KgaA verwendet. LiChrospher[®] ADS gehört zu den dualen RAM Adsorbentien mit physikalischer Ausschlussbarriere [90]. Der poröse Träger besteht aus sphärischen Kieselgelpartikeln. Die äußere Oberfläche weist Diol-Gruppen auf. Sie sind hydrophil und elektro-neutral. Sie verhindern die unspezifische, irreversible Adsorption von Proteinen und anderen makromolekularen Probenbestandteilen und gewährleisten so die Biokompatibilität. Nur die innere Oberfläche der porösen Teilchen besitzt eine hydrophobe Verteilungsphase. Diese Adsorptionszentren sind für niedermolekulare Probenkomponenten frei zugänglich [91]. Der Mechanismus ist in Abbildung 9 dargestellt.

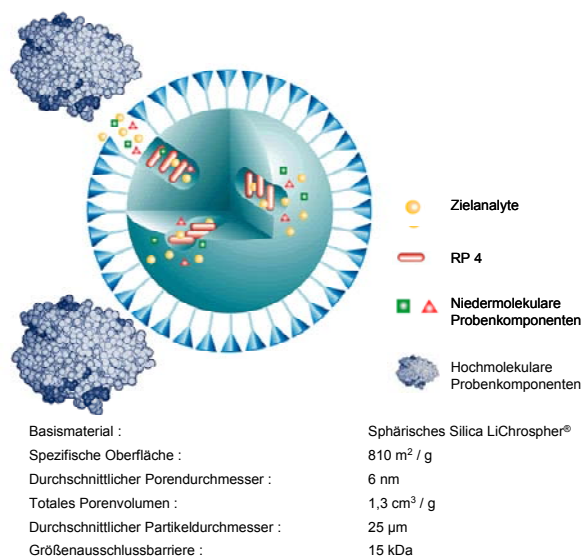


Abbildung 9: Extraktions- und Fraktionierungsmechanismus von „Restricted Access Materialien“ und ihre Spezifikationen [91-92].

Dieses Material ist als SPE-Kartusche nicht kommerziell erhältlich. Daher wurde es in einer Sonderanfertigung von der Firma Spark Holland in entsprechende Kartuschen gepackt.

SPE-Materialien mit Ionenaustauschern

Ionische und ionisierbare Analyte können durch Ionenpaar- und Ionenaustauschersorbentien aufgereinigt werden. Kationenaustauscher besitzen schwache Carbonsäuren oder starke aromatische oder nicht-aromatische Sulfonsäuregruppen. Anionenaustauscher besitzen dagegen schwache primäre Aminogruppen oder starke quarternäre Amine. Dabei kommt es zu einer Retention der Analyte bei einem pH-Wert, bei dem sie in einer ionisierten Form vorliegen. Zur Desorption kommt es, wenn die Analyte in ihrer nicht ionisierten Form vorliegen.

Beim Gebrauch zur Aufreinigung von biologischen Proben ist die große Anzahl an anorganischen Ionen nachteilig. Sie können schnell zum Überladen der Sorbenskapazität führen [58, 91].

SPE-Materialien mit „mixed-mode“ Sorbentien

„Mixed-mode“ Sorbentien besitzen zwei oder mehrere SPE-Extraktionsmodi innerhalb einer Säule bzw. Kartusche. Eine gängige Kombination ist eine Umkehrphasenchromatographie mit einem Ionenaustauschmechanismus. Sowohl für schwache Säuren und Basen als auch für starke Säuren und Basen gibt es Anionen- und Kationen-„mixed-mode“ Sorbentien. Vorteil dieser Materialien ist die verbesserte Selektivität beim Extraktionsschritt. Es werden sehr saubere Extrakte erhalten.

Die Extraktion eines leicht basischen Arzneistoffes auf einer starken Kationenaustauscher-„mixed-mode“ Phase erfolgt in folgender Weise: zuerst wird das Adsorbens mit der Säure äquilibriert, mit der später der Analyt auf das Material aufgebracht wird. Im wässrigen Milieu ist es nicht möglich, die Sulfonsäuregruppen des Kationenaustauschers zu protonieren, sodass dieser freie Sulfonsäureanionen aufweist. Im nächsten Schritt wird die Probe mit dem Analyten auf die Kartusche gespült. Durch die saure mobile Phase liegt der Analyt vollständig protoniert vor und kann so an die Sulfonsäureanionen des Kationenaustauschers binden. Der hydrophobe Interaktionsmechanismus ist bei diesem pH-Wert sehr gering, sodass hydrophobe Matrixbestandteile kaum reteniert werden. Die Desorption und Elution der Analyte erfolgt durch eine mobile Phase, in der die Analyten in ihrer nicht ionisierten Form vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Oasis[®]-Materialien der Firma Waters verwendet. Sie besitzen eine mit Wasser benetzbare polymerische Gerüststruktur. Die Materialien Oasis[®] MCX und WCX haben jeweils duale Funktionalität. Eine Sulfonsäuregruppe bildet die starke anionische funktionale Gruppe des MCX-Materials, eine Carbonsäuregruppe bildet die schwache anionische funktionale Gruppe des WCX-Materials. Die copolymerische Gerüststruktur dagegen bietet die Retentionsmöglichkeit für hydrophobe und hydrophile Mechanismen. Der Mechanismus ist in Abbildung 10 dargestellt.

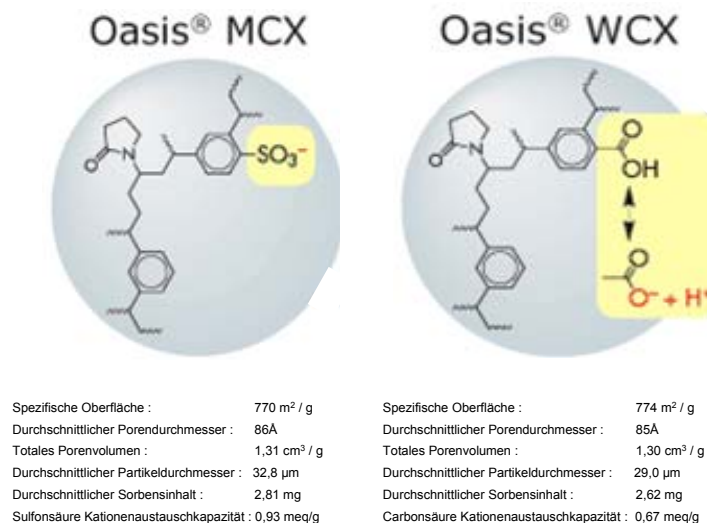


Abbildung 10: Extraktions- und Fraktionierungsmechanismen von Oasis® MCX- und WCX-Materialien und ihre Spezifikationen [93].

2.2.2 Methodenentwicklung in der bioanalytischen HPLC

Zusätzlich zu einer angemessenen Probenaufbereitung ist häufig eine gute chromatographische Trennung notwendig, um eine ausreichend spezifische bioanalytische LC/MS-Methode zu erstellen [94]. Denn mit der Originalsubstanz coeluierende Matrixsubstanzen können den Ionisierungsprozess stören und so zu verringerten Signalen und einem fehlerhaften Quantifizierungsprozess führen [94]. Des Weiteren kann die Metabolisierung eines Pharmakons zur Bildung mehrerer isobarer Substanzen führen. Diese können durch das Massenspektrometer nicht unterschieden werden. Außerdem können instabile Substanzen in der MS-Quelle durch Hitze degradieren. Eine gute Auflösung ist daher vorteilhaft.

Bei Trennproblemen in der HPLC ist es das Ziel, eine höchst mögliche Auflösung der einzelnen Signale zu erreichen. Die Auflösung wird durch die Gleichung in Abbildung 11 beschrieben.

$$R_S = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{1 + k} \sqrt{N}$$

R_S = chromatographische Auflösung

α = Selektivität

k = Retentionsfaktor

(zuletzt von der Trennsäule eluierende Verbindung)

N = Bodenzahl

Abbildung 11: Gleichung für die chromatographische Auflösung (R_S).

Die Selektivität hat den größten Einfluss auf die Auflösung. Beeinflusst wird diese in der HPLC durch vier Variable:

- die Zusammensetzung der mobilen Phase (Lösemittelstärke, Additive, pH-Wert),
- die stationäre Phase (Art der Phase, Säulenlänge, Säulendurchmesser, Partikeldurchmesser),
- die physikalischen Analysenbedingungen (Temperatur und Druck) und
- die Natur der Analyte [95].

Bei der Methodenentwicklung in der HPLC ergeben sich daraus drei Optimierungsschritte: Stationäre Phase, mobile Phase und/oder Analysenbedingungen [96].

2.2.2.1 Konventionelle Methodenentwicklung

In der herkömmlichen etablierten Methodenentwicklung ist es ein zeitaufwendiger und kostspieliger Faktor, die richtige Phase aus den beispielsweise über 800 [97] verschiedenen Umkehrphasenmaterialien zu wählen. Dafür werden verschiedene HPLC-Säulen durch schnelle Gradienten über kurze Trennsäulen getestet. Die Säule mit der besten Trennleistung wird dann zur weiteren Trennoptimierung zusätzlichen Testverfahren unterzogen. Neuere Ansätze schlagen eine Modifikation der chemischen Zusammensetzung, eine Herstellung von Mischphasen, eine Kopplung von mehreren Säulen hintereinander bzw. die Optimierung der stationären Phase vor [96, 98-103].

Die Optimierung der Zusammensetzung der mobilen Phase und/oder die Ermittlung der Prozessparameter sind zwei weitere Faktoren, die weitaus einfacher zu variieren sind.

2.2.2.2 *Phasen-optimierte Flüssigkeitschromatographie (Phase Optimized Liquid Chromatography, POPLC)*

Die Phasen-optimierte Flüssigkeitschromatographie stellt einen neuen Ansatz in der Methodenoptimierung dar. Sie basiert auf der Optimierung der stationären Phase und wird von der Firma Bischoff Chromatographie in verschiedenen Kits, die ein segmentiertes Säulensystem beinhalten, vermarktet. Mit der Phasen-optimierten Flüssigkeitschromatographie lassen sich Säulensegmente verschiedener Längen (10, 20, 40, 60, 80mm) totvolumenfrei zu einem Säulensystem zusammenfügen. Durch ihre stark unterschiedlichen Selektivitäten decken sie den Bereich der Umkehrphasenchromatographie nahezu vollständig ab [104].

Das Basiskit enthält folgende fünf unterschiedliche Phasen [105]:

- Eine klassische „endcapped“ C18-Phase, die vorwiegend hydrophobe Wechselwirkungen eingeht,
- eine C18-Phase mit eingebundener polarer Gruppe (diese geht wie die klassische C18-Phase hydrophobe Wechselwirkungen ein; zusätzlich besitzt sie eine hohe polare Selektivität),
- eine Phenyl-Phase, die π - π -Wechselwirkungen eingeht,
- eine Cyano-Phase, die polare Wechselwirkungen eingeht,
- und eine C30-Phase mit molekularer Formerkennung.

Prinzip der Phasen-optimierten Flüssigkeitschromatographie

Abbildung 12 zeigt das Prinzip der POPLC schematisch.

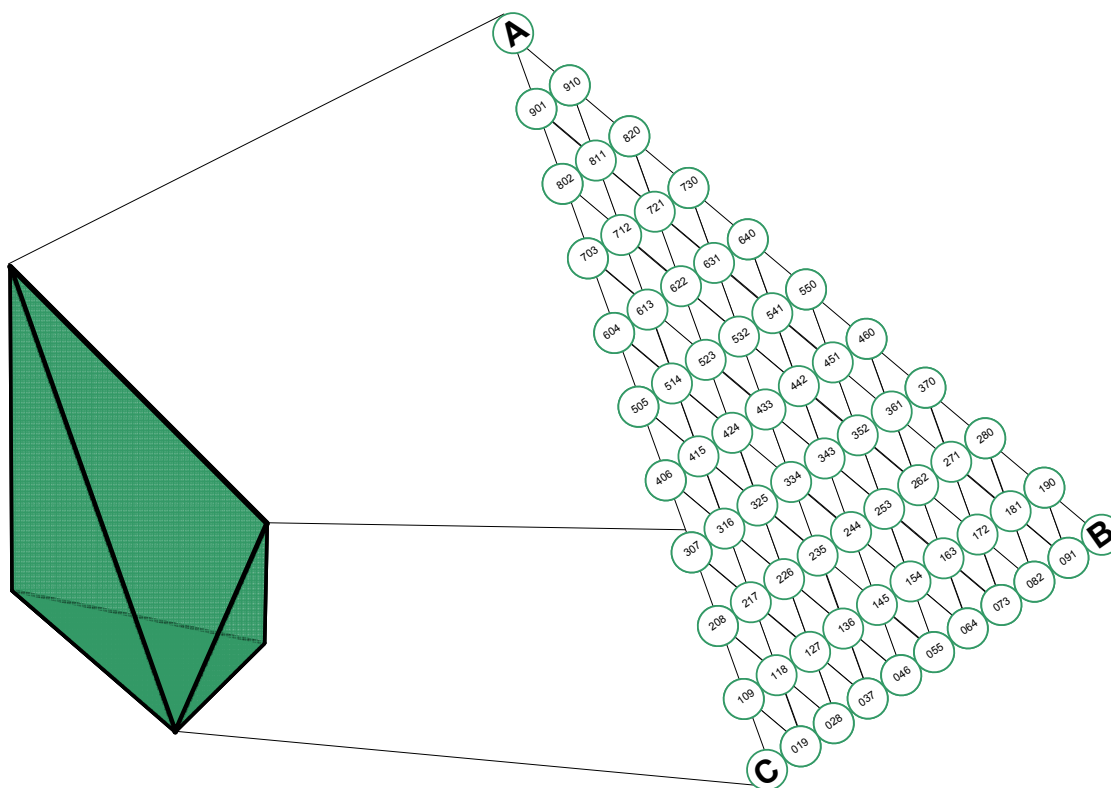


Abbildung 12: Geometrisches Prisma Modell. Das aufgespannte Dreieck dient in der Phasen-optimierten Flüssigkeitschromatographie als Optimierungshilfe zur Bestimmung der Selektivität von stationären Phasen. Dabei stehen die Eckpunkte für verschiedene stationäre Phasen. Die Länge der Seiten repräsentiert die finale Länge der analytischen Säule. Jede Zahlenkombination in den Kreisen stellt eine Segmentkombination einer analytischen Säule aus den verschiedenen stationären Phasen dar.

Das Prinzip der Phasen-optimierten Flüssigkeitschromatographie basiert auf der Theorie des Prisma-Modells, das schon früher zur Optimierung der flüssigchromatographischen mobilen Phase in der HPLC eingesetzt wurde [105-107]. Die Höhe der Schenkel des Prismas repräsentiert hierbei die Retentionsstärke der eingesetzten stationären Phasen für einen entsprechenden Analyten. Die optimale Retentionsstärke für diesen Analyten liegt irgendwo in der Fläche, die vom Prisma aufgespannt wird und kann durch geschickte Kombination der einzelnen stationären Phasen A, B und C eingestellt werden [97]. Die Ziffern in jedem Kreis (Kombinationsmöglichkeit) beschreiben die Längen der jeweiligen stationären Phasen in der Säule. Die Reihenfolge der stationären Phasen in der Säule hat keinen Einfluss auf die Selektivität.

Bei Mischphasen addieren sich alle chromatographischen Retentionsparameter. Dieses wird mit folgender Gleichung beschrieben (Abbildung 13):

$$K_{\text{total}} = \Phi_A k_A + \Phi_B k_B + \Phi_C k_C + \dots = \sum \Phi_i k_i$$

K_{total} = Retentionsfaktor im gesamten Säulensystem

k = Retentionsfaktor einer stationären Phase

Φ = relativer Anteil einer stationären Phase

Abbildung 13: Retentionsfaktor (k_{total}): Die Summe aller chromatographischen Retentionsparameter auf den einzelnen stationären Phasen ergeben bei Mischphasen den Retentionsfaktor eines Analyten im gesamten Säulensystem.

Methodenentwicklung mit Hilfe der POPLC

Zunächst wird anhand der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analyten eine mobile Phase gewählt. Danach werden die Retentionszeiten (k) aller Komponenten und ihre Totzeit (t_0) unter gleichen isokratischen Bedingungen auf den verschiedenen stationären Phasen bestimmt. Die so ermittelten Daten werden im nächsten Schritt in eine Optimierungssoftware eingegeben. Diese Auswertesoftware basiert auf einem von Nyiredy entwickelten Prisma-Modell [103]. Die Software errechnet aus den eingegebenen Parametern die optimale Zusammensetzung der Trennsäule und die Anzahl der dafür benötigten Säulensegmente. Darüber hinaus zeigt sie eine Simulation des zu erwartenden Chromatogramms. Die vorgeschlagene Phasenkombination wird nun aus Säulensegmenten zusammengesetzt. In der Optimierungssoftware stehen alle möglichen Säulenkombinationen und ihre Simulationschromatogramme zur Ansicht zur Verfügung. Dadurch besteht die Möglichkeit, auch spezifische Trennprobleme semiempirisch zu ermitteln. Eine weitere Optimierung kann im Anschluss durch das Einstellen der mobilen Phasen oder der physikalisch-chemischen Analysenbedingungen (Temperatur, Druck, usw.) vorgenommen werden.

Vorteile der POPLC liegen vor allem in der vorwiegend isokratischen Arbeitsweise, die das für eine Gradiententechnik notwendige Äquilibrieren der Säulen entfallen lässt. Dies führt zu verkürzten Analysenzeiten. Des Weiteren ist der apparative Aufwand geringer, was wiederum zu einer höheren Robustheit der Methode führt. Ein weiterer Vorteil der isokratischen HPLC ist ein konstanter Detektorhintergrund, der für eine massenselektive Detektion vorteilhaft ist.

Darüber hinaus führt der Einsatz eines hohen Anteils an organischem Modifier auch meist zu einer höheren Ionisationsausbeute.

2.3 Massenspektrometrie in der Bioanalytik

Die Anwendung massenspektrometrischer Analysenmethoden gewinnt in der klinisch-chemischen Labordiagnostik zunehmend an Bedeutung. In den vergangenen 15 Jahren kam es zu einer sprunghaften Entwicklung massenspektrometrischer Applikationen [89-92]. Der Durchbruch ist den Ionisationsmethoden unter Atmosphärendruck zu verdanken [108-109]. Gegenwärtig wird die HPLC-MS/MS in der Labordiagnostik hauptsächlich im Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechseldefekte, in der Therapeutischen Arzneimittelkontrolle für Immunsuppressiva und für antiretrovirale HIV-Arzneimittel (Protease Inhibitoren) und bei toxikologischen Fragestellungen genutzt.

Von den 6 vorgesehenen Charakteristika einer guten analytischen Methode in der Labordiagnostik: Selektivität, Präzision, Sensitivität, Probendurchsatz, Handhabung und Automatisierung besitzt die Massenspektrometrie die Vorteile einer hohen Selektivität und Präzision. Sensitivität und Probendurchsatz sind von dem zu untersuchenden Analyten abhängig [110]. Durch die leichtere Handhabung und den Trend zur Automatisierung gewinnt die HPLC-MS/MS zunehmend an Bedeutung.

2.3.1 Prinzip der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein physikalisches Analysenverfahren zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Das Prinzip aller Massenanalysatoren beruht auf der Auftrennung positiv oder negativ geladener Ionen proportional zu ihren Masse/Ladungsverhältnissen (m/z) [111].

2.3.2 Ionisationstechniken

Voraussetzung für die massenspektrometrische Trennung im Massenanalysator ist die Ionisierung der Analyten. Für die Analytik von Biomolekülen werden vor allem die „schonenden“ Ionisationstechniken unter Atmosphärendruck (API) eingesetzt. Die Verwendung der verschiedenen API Ionisationstechniken hängt hauptsächlich von der Molekülgröße und der Polarität des Analyten ab [112]. Ein grobes Schema ist in Abbildung 14 dargestellt.

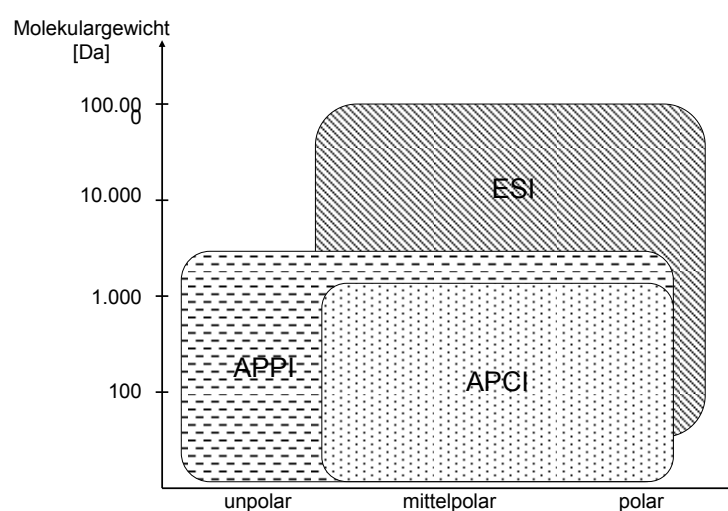


Abbildung 14: Ionisationstechniken. Anwendungsbereiche der Ionisationstechniken unter Atmosphärendruck in Abhängigkeit von der Polarität und des Molekulargewichtes des Analyten: Elektrospray-Ionisation (ESI), chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) und Photoionisation unter Atmosphärendruck (APPI) [112].

Dabei werden drei verschiedene technische Varianten unterschieden: die Elektrospray-Ionisation (ESI), die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) und die Photoionisation unter Atmosphärendruck (APPI).

2.3.2.1 Elektrospray-Ionisation (*Electrospray Ionisation, ESI*)

Die Elektrospray-Ionisation ist ein sehr niedrigerenergetischer (1-10eV) oder “weicher” Ionisationsprozess, der die Bildung intakter Quasimolekülonen (z.B. $[M+H]^+$) mit einer oder mehreren Ladungen ermöglicht [113]. Bei der ESI wird das Eluentengemisch aus der HPLC oder aus der Spritzenpumpe durch eine Kapillare kontinuierlich versprüht. Am Ausgang der Kapillare wird ein starkes elektrisches Feld unter Atmosphärendruck angelegt. Dies wird durch eine Potenzialdifferenz zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode erreicht. Ist die Kapillare positiv geladen, entstehen positiv geladene Ionen und umgekehrt.

Der Vorgang der Elektrospray-Ionisation ist in Abbildung 15 dargestellt:

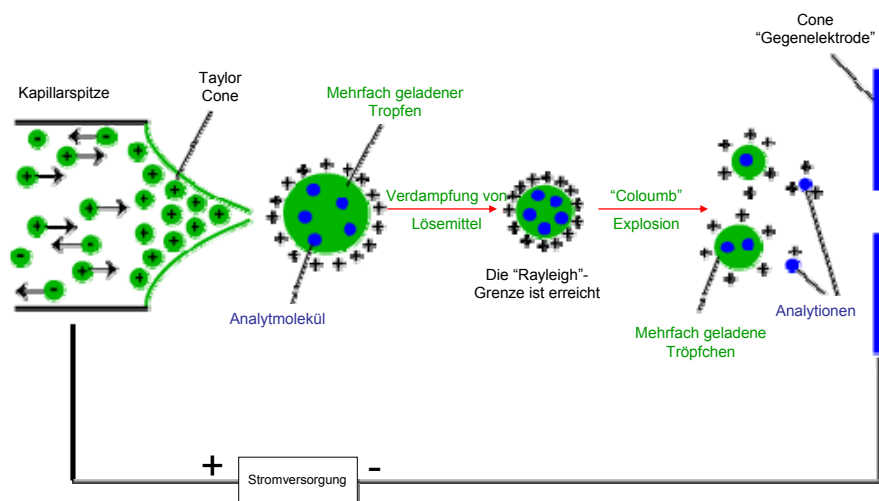


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Ionisationsprozesses der Elektrospray-Ionisation [114].

Die Erzeugung der Ionen lässt sich vereinfacht in drei Schritte unterteilen:

1. die Erzeugung elektrisch geladener Tröpfchen durch Vernebelung der Probenlösung an der Spitze der Elektrospray Kapillare,
2. die Erhöhung der Ladungsdichte durch Lösemittelverdampfung und
3. die Freisetzung der Ionen durch Coulomb-Explosion .

Der genaue Mechanismus ist Gegenstand einer langjährigen Diskussion [115-116]. Nach der Vernebelung werden die geladenen Tropfen von der Gegenelektrode, der Cone angezogen. Währenddessen verdunstet Lösemittel und die Tropfen schrumpfen. Sobald die elektrostatische Abstoßung stärker ist als die Oberflächenspannung (Rayleigh Grenze), kommt es zur sogenannten „Coulomb-Explosion“. Die Tropfen zerreißen, kleinere elektrisch geladene

Tröpfchen verlassen die Oberfläche und bewegen sich durch die Gasphase zur Gegenelektrode. Dieser Vorgang kann sich so oft wiederholen, bis einfach oder mehrfach geladene Moleküle oder Ionen entstehen [117]. Diesem Prozess wurde 1976 eine weitere Theorie gegenübergestellt. Iribarne und Thomson sind der Auffassung, dass elektrische Ladungen an der Oberfläche der Tropfen so energiereich sind, dass dies ausreichend ist, um solvatisierte Ionen zu erzeugen [118].

2.3.2.2 Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI) und Atmosphärendruck-Photoionisation (Atmospheric Pressure Photo Ionisation, APPI)

Die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck und die Photoionisation unter Atmosphärendruck erlauben die Ionisierung weniger polarer und flüchtiger Analyte [119]. Hierdurch wird die Palette massenspektrometrisch messbarer Analyte deutlich erweitert.

Bei der APCI wird der Analyt zusammen mit dem Lösemittel durch eine beheizbare Kapillare geführt (300-400°C), wobei es zur vollständigen Verdampfung des Gemisches kommt. Das Prinzip wurde 1973 von Horning beschrieben [120]. Danach wird das verdampfte Lösemittel-/Analytgemisch über eine Corona-Entladungsnadel geführt. Durch elektrische Entladung wird unmittelbar vor dem Einlass zur Hochvakuumregion des Massenspektrometers ein Plasma erzeugt. Dies besteht aus dem Desolvationsgas Stickstoff, welches mit den Analyten reagiert. Dadurch werden Primärionen wie N_2^+ , N_4^+ und H_3O^+ erzeugt (Abbildung 16).

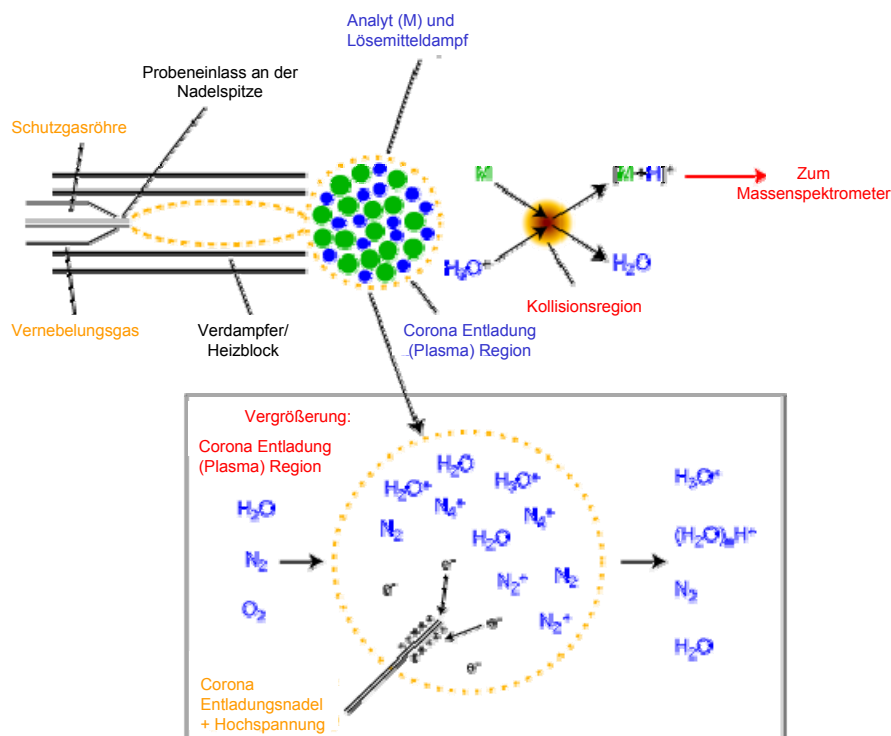


Abbildung 16: Schematische Darstellung der chemische Ionisation unter Atmosphärendruck [121].

Die APPI bei der LC-MS Analyse wurde im Jahr 2000 zum ersten Mal beschrieben [122]. Bei der APPI erfolgt ebenso wie bei der APCI die Verdampfung des Analytgemisches in einer beheizbaren Kapillare. Zusätzlich wird ein zweites Lösemittel (Dopand) zur Unterstützung der Ionisierung durch UV-Licht zugeführt. Es werden geladene Dopand-Moleküle gebildet, die durch Protonen- bzw. Ladungstransfer indirekt den Analyten ionisieren.

2.3.3 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die durch den Ionisierungsprozess gebildeten Ionen im elektrischen Feld können mit Hilfe verschiedener Trennsysteme nach ihrer Masse getrennt werden. Für labordiagnostische Applikationen sind vor allem die Quadrupoltechnik und die Flugzeit-Massenspektrometrie (Time of Flight, TOF) von Bedeutung.

Die Schaltung von zwei Quadrupol-Massenfiltern in Reihe wird als Tandem-MS bezeichnet. Dadurch gewinnt diese Detektionsmethode an zusätzlicher Selektivität und Sensitivität. Die

erfassbaren Massenbereiche im Quadrupol-Analysator liegen bei maximal 4 kDa. Da in dieser Arbeit jedoch ausschließlich mit einem Tandem-Massenspektrometer gearbeitet wurde, wird im Folgenden nur auf ein solches Massenspektrometer eingegangen.

2.3.3.1 Aufbau

In Abbildung 17 ist der Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers zu sehen.

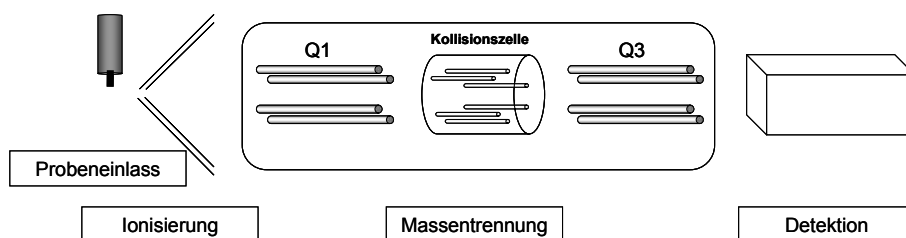


Abbildung 17: Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers.

Nachdem die Probe in das System gelangt, wird sie ionisiert. Die Ionen treten in den Hochvakuumbereich ein und werden durch den folgenden Mechanismus getrennt. An den vier gegen-überliegenden parallel angeordneten Stabelektroden wird eine Gleichspannung angelegt, die von einer hochfrequenten Wechselspannung überlagert wird. Durch die Variation der Gleich- und Wechselspannung durchfliegen jeweils nur die Ionen einer bestimmten Masse den Quadrupol und gelangen so zum Detektor. Alle anderen Ionen werden entladen und durch das Pumpsystem abgesaugt [111].

2.3.3.2 Tandem-massenspektrometrische Modi operandi

Produktionenscan

Beim Produktionenscan wird im ersten Massenfilter auf ein spezifisches Masse-zu-Ladungsverhältnis fokussiert. Im dritten Massenfilter werden alle Produktionen, die durch die Fragmentierung entstehen, über einen definierten Massenbereich gemessen.

Vorläuferionenscan

Beim Vorläuferionenscan wird ein bestimmtes Masse/Ladungsverhältnis des Produktions im zweiten Massenfilter gewählt. Bestimmt werden dann die Vorläuferionen im ersten Massenfilter, die durch Fragmentierung zu dem gewählten Produktion geführt haben.

Scan eines bestimmten Massenübergangs

Beim Selected Reaction Monitoring (SRM) wird eine bestimmte Fragmentationsreaktion gemessen. Dafür werden beide Massenfilter auf ein spezifisches Masse/Ladungsverhältnis gesetzt.

Neutralteilchenscan

Beim Neutralteilchenscan wird ein neutrales Fragment ausgewählt. Es werden dann alle Fragmentationen detektiert, die zu diesem Neutralteilchen führen. Voraussetzung dafür ist, dass beide Massenfilter gleichzeitig über einen bestimmten Massenbereich mit einem bestimmten Abstand messen.

Grundsätzlich sind folgende Modi operandi möglich (Abbildung 18):

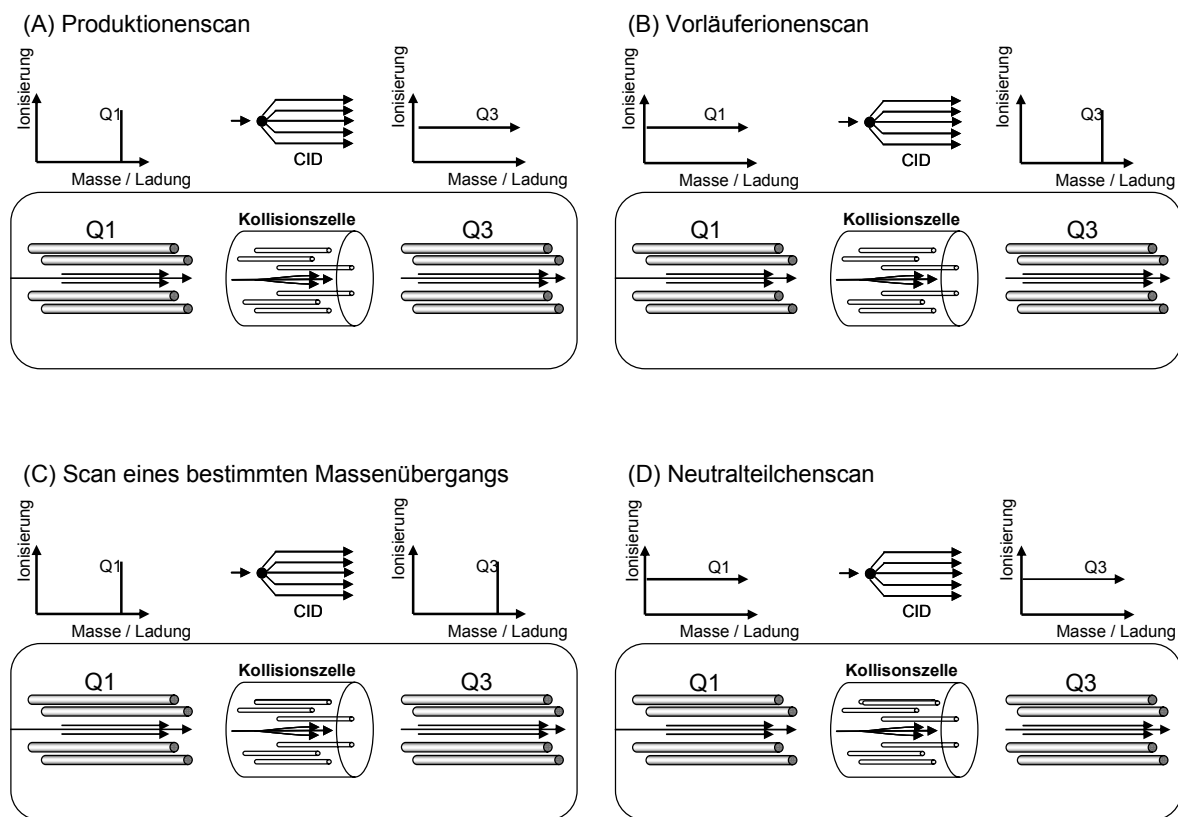


Abbildung 18: Schematische Darstellung der tandem-massenspektrometrischen Detektionsmodi:

(A) Produktionenscan, (B) Vorläuferionenscan, (C) Scan eines bestimmten Massenübergangs und (D) Neutralteilchenscan. Die Bezeichnungen Q1 und Q3 repräsentieren Quadrupol Massenfilter. Die Bezeichnung Q2 steht für eine Quadrupol-Reaktionskammer, in die ein inertes Kollisionsgas eingeführt werden kann. In der Reaktionskammer kommt es zur Fragmentierung (collision induced dissociation, CID). Die umrandete Fläche steht unter Vakuum [in Anlehnung an [108, 123]].

In der vorliegenden Arbeit wurde fast ausschließlich mit Scans bestimmter Massenübergänge gearbeitet. Soll nur ein Analyt erfassen werden, so sind beide Massenfilter auf einen definierten Massenübergang einzustellen (single reaction monitoring, SRM). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Massenfilter infolge der schnellen Scanzeiten eine Vielzahl von definierten Massenübergängen erfassen (multiple reaction monitoring, MRM). Auf diese Weise wird die gleichzeitige Messung verschiedener Analyte ermöglicht. Hierbei werden im ersten Quadrupol durch das Masse/Ladungsverhältnis definierte Vorläuferionen erzeugt und detektiert. Durch die anschließende Kollision mit Stickstoff oder Argon werden diese Vorläuferionen fragmentiert. Die gebildeten substanzspezifischen Fragmente sind vergleichbar mit einem Fingerabdruck der einzelnen Analyte und werden im zweiten

Quadrupol detektiert. Das Tandem-Massenspektrometer ermöglicht somit neben der genauen Quantifizierung des Analyten im ersten Quadrupol eine präzise Identifizierung des Analyten anhand seiner spezifischen Fragmente im zweiten Quadrupol. Somit wird eine besonders hohe analytische Sensitivität und Spezifität erreicht [111, 123].

2.3.4 Kopplung von Flüssigkeitschromatographie an die Massenspektrometrie (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)

Die API stellt die Basis für die Kopplung von Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektrometrie (MS) dar und wurde bereits 1968 beschrieben [117, 123]. HPLC-ESI-MS/MS ist das zurzeit am meisten angewandte Verfahren in der Quantifizierung von Analyten aus biologischen Matrices [56, 72, 124]. Die räumliche Entkopplung von Ionisierung und massenspektrometrischer Detektion bietet gegenüber der Ionisierung im Vakuum für die Kombination mit der LC Vorteile. Außerdem sind aufgrund von Mehrfachladungen Analysen von Molekülen bis zu 40 kDa möglich.

Die Art und Effektivität der Bildung von Ionen in der Gasphase ist von der Ionenstruktur abhängig. Sie werden von der Flussrate, der Zusammensetzung und vom pH-Wert des Eluenten, von der Konzentration des Analyten in der Lösung und von den Matrixbestandteilen der Probe beeinflusst.

Die Wahl der mobilen Phase kann erheblichen Einfluss auf die Ionisationsausbeute haben. ESI bildet schnell Addukte mit „harten“ Ionen wie Natrium und Chlorid. Die beste Sensitivität wird mit der Bildung von Ammoniumaddukten erreicht. Deswegen sollten alle kompetitiven Ionen aus dem Eluentenstrom fern gehalten werden [108]. Darüber hinaus toleriert ESI keine hohen Salzkonzentrationen und keine nicht-polaren Lösemittel. Deswegen sollten die Pufferkonzentrationen so gering wie möglich gehalten werden. Puffer und pH-Modifizier sollten darüber hinaus verdampfbar sein. Theoretisch ist es zwar technisch möglich, ein Massenspektrometer mit nicht-verdampfenden Puffern wie beispielsweise Phosphaten zu nutzen, jedoch muss das angestaute Salz aus der Quelle regelmäßig entfernt werden. Empfohlen wird der Gebrauch von Ameisensäure, Essigsäure, Ammoniak, Triethylamin,

Carbonaten, Ammoniumformiat, Ammoniumacetat und Ammoniumcarbonat. Ionenpaar-reagenzien und Agentien zur Reduzierung der Oberflächenspannung sollten vermieden werden, da sie den Ionisationsprozess stören und Ionensuppression hervorrufen. Auch Trifluoressigsäure verringert das Analytensignal [125].

Es können Flussraten bis zu 1 mL/min verwendet werden, jedoch wird oft ein Split des Flusses auf 100-200 µL/min empfohlen [123].

2.3.5 Matrixeffekte in der bioanalytischen HPLC-MS/MS

Bei der LC-MS/MS Analyse von Analyten aus komplexen biologischen Matrices, wie beispielsweise Urin, Plasma, Serum und Vollblut, wurden starke Schwankungen in der Wiederfindung beschrieben [5-6, 126-128].

Diese Schwankungen werden auf Matrixeffekte zurückgeführt und sind mittlerweile die wichtigsten Gründe für das Versagen einer Methode und für Fehler in der Bioanalytik [129]. Sie sind besonders bedenklich, wenn Analyte, die im Nanogramm-Bereich liegen, quantifiziert werden. In der labormedizinischen Anwendung können darüber hinaus eine Vielzahl von exogenen Substanzen wie z.B. Heparin oder Weichmacher von Abnahmesystemen und Pipettenspitzen die Ionisation unterdrücken oder verstärken [5]. Außerdem wird die Effektivität der Ionisation durch den Salzgehalt des Eluenten bzw. der Probenmatrix stark beeinflusst [130], da Natrium und Chloridionen mit der Ionisation des Analyten konkurrieren. Aus diesem Grund sollten nur salzfreie Eluatgemische eingesetzt werden.

Eine validierte bioanalytische Methode sollte auf Matrixeffekte untersucht worden sein, weil sich daraus die Zuverlässigkeit und Selektivität einer HPLC-MS/MS-Methode ableitet [56]. Darüber hinaus wird die Notwendigkeit der Untersuchung von Matrixeffekten in aktuellen Regularien beschrieben und die Bestimmung und Elimination von Matrixeffekten gefordert [131-132]. Bis heute existieren jedoch keine klaren Richtlinien für deren Bestimmung.

2.3.5.1 *Definition von Matrixeffekten*

Das Phänomen der Matrixeffekte wurde zum ersten Mal von Kebarle und Tang beschrieben [133]. Die Schwankungen in der Ionisationseffizienz wurden durch Anwesenheit von coeluierenden, nicht flüchtigen Substanzen hervorgerufen [134]. Als Matrixeffekt wird der Unterschied zwischen dem massenspektrometrischen Signal für die Zielanalyte in einer Standardlösung und dem Signal für dieselben Zielanalyte in einer biologischen Matrix bezeichnet [135]. Matrixeffekte sind demnach nur solche Verminderungen oder Verstärkungen der Ionisationsausbeute, die durch endogene Matrixbestandteile hervorgerufen werden [128]. Diese Effekte sind in einem Chromatogramm nicht sichtbar, haben aber großen Einfluss auf die Methodenpräzision und Sensitivität [136]. Dazu kommt die individuelle Zusammensetzung der einzelnen Plasmaproben [56]. Diese biologische Variabilität erhöht zusätzlich die Impräzision.

Alle Ionisationstechniken, vor allem aber die ESI, können durch Matrixeffekte beeinflusst werden [56, 109, 127]. Durch ihren unvorhersehbaren Charakter gehören Matrixeffekte damit zu den limitierenden Faktoren [72, 127] und sind deswegen ein wichtiges Phänomen in der LC-MS Analyse [56, 137].

2.3.5.2 *Ursachen und Mechanismen der Matrixeffekte*

Matrixeffekte resultieren aus coeluierenden Matrixbestandteilen [56, 138]. Des Weiteren werden Matrixeffekte durch Ionisationseffekte aus interferierenden Metaboliten oder Internen Standards, aus „in-source“ Fragmentation von Metaboliten und aus „cross-talks“ verursacht. Von „cross-talk“ wird gesprochen, wenn Analyte nicht „Basislinien“ getrennt werden und die Analytsignale auch auf einem nicht zum Analyten gehörenden anderen Massenübergang detektiert werden [139]. So wurde beispielsweise von Bogusz et al. berichtet, dass sich die Signale für Ciclosporin A und Ciclosporin D gegenseitig beeinflussen. Dabei steuert Ciclosporin A ca. 0,6% zum Signal für Ciclosporin D bei und Ciclosporin D ca. 0,9% zum Signal von Ciclosporin A [140].

Stark an biologische Matrices bindende Zielanalyte führen zu schlechter Analytwiederfindung und zählen daher ebenso zu den Matrixeffekten [129]. Auch intermolekularer Ladungstransfer in der Gasphase kann zu Matrixeffekten führen [56, 134]. Dabei können weniger flüchtige Substanzen die Effizienz der Tröpfchenbildung oder -verdampfung beeinflussen. Dadurch wird die Menge der geladenen Ionen in der Gasphase, die den Detektor erreichen, beeinflusst [134, 137]. Gemeinsam haben alle Matrixeffekte, dass sie sich in Ionensuppression bzw. –verstärkung äußern.

Die Suppression und die Verstärkung der Ionisation können durch sehr unterschiedliche Faktoren hervorgerufen werden. Dabei können auch Lösemitteladditive und Komponenten der mobilen Phase Gründe für eine Ionensuppression sein [137]. Jedoch ist deren Einfluss, verglichen mit der Ionensuppression, die durch endogene Verbindungen aus biologischen Matrices hervorgerufen werden können, eher gering einzuschätzen [136].

Durch Matrix-induzierte Ionensuppression werden insbesondere früh eluierende Zielanalyte beeinflusst [56]. Innerhalb einer Analyse können jedoch mehrere endogene Substanzen an einer Ionensuppression beteiligt sein. Sie entstehen immer zu dem Zeitpunkt, an dem diese Substanzen von der analytischen Säule eluiert werden [6].

Die Matrixeffekte in bioanalytischen Methoden sind zum großen Teil den endogenen Phospholipiden zu zuschreiben [135, 141-144]. Phospholipide sind im menschlichen Plasma in hohen Konzentrationen enthalten (~1,6-3,9mg/mL). Dabei bestehen die Plasmaphospholipide zu 70% aus Phosphatidylcholin [142]. Phospholipide sind darüber hinaus auch zahlreich in biologischen Membranen vertreten. Insbesondere die Phospholipidklassen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin wurden als häufiger Grund für Matrixeffekte identifiziert. Diese Phospholipide sind in fast allen Extraktionstechniken bzw. Extrakten, die normalerweise in der Bioanalyse verwendet werden, präsent. Sie können beispielsweise auf der analytischen Säule akkumulieren und zu jedem Zeitpunkt mit variierender Konzentration wieder eluieren. Daraus resultieren schwankende Retentionszeiten, divergente Kurven und unpräzise Ergebnisse. Phospholipidkonzentrationen können stark interindividuell schwanken (20-50%) und sind abhängig vom Zeitpunkt der Probenabnahme [143]. Phospholipide sind sehr apolar und eluieren deswegen spät von einer Umkehrphasensäule. So können sie leicht mit unpolaren Analyten interferieren. Eine komplette Elution von Phospholipiden wird am besten durch reines Methanol erreicht.

Matuszewski et al. konnten zeigen, dass Matrixeffekte Substanz- und Matrixabhängig sind [56]. Bonfiglio et al. zeigten, dass die Struktur der Zielanalyte wahrscheinlich einen größeren Einfluss auf das Ausmaß der Ionisationsschwankungen hat, als die Methode der Probenaufbereitung. Polare Analyten scheinen sensitiver gegenüber Ionisationsprozessen zu sein als unpolare [6]. Dams et al. haben gezeigt, dass die interferierenden Matrixbestandteile von der zu analysierenden biologischen Flüssigkeit abhängig ist, und dass diese in Plasma weitestgehend polarer Natur sind [127].

2.3.5.3 Bestimmung von Matrixeffekten

Die Anwesenheit von Matrixeffekten in einer biologischen Matrix kann auf einfache Weise nachgewiesen werden. Bei der Nachextraktions-Supplementations-Methode [56] wird der Zielanalyt in einer Interferenz-freien Lösung, beispielsweise Standardlösung, in einer bekannten Konzentration gelöst. Mit derselben Konzentration des Zielanalyten wird eine Matrixprobe dotiert. Der Vergleich der Signale zeigt den Einfluss an Substanzen, die nur in der Matrixprobe enthalten sind [128]. Nachteilig an dieser Methode ist, dass keine Informationen über das zeitliche Vorkommen der Interferenzen in der Analyse verfügbar sind. Diese Methode kann als statisch beschrieben werden, da sie nur Informationen über Matrixeffekte zum Zeitpunkt der Elution der Analyte gibt [124].

Eine Möglichkeit Informationen über Matrixeffekte zum Zeitpunkt der Suppression oder Verstärkung der Ionisation zu bekommen, ist die Aufnahme eines Full-Scans der extrahierten Matrix. Jedoch sind die interferierenden Substanzen auch hierbei nicht direkt zugänglich [6] und die qualitative Analyse der interferierenden Substanzen ist relativ schwierig [145].

Eine häufig genutzte Methode zur Bestimmung von Matrixeffekten ist daher die dynamische Nachsäuleninfusion [6, 146]. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie Aufschluss über das chromatographische Zeitprofil und das Ausmaß der interferierenden Substanzen gibt. Somit können auch semiquantitative Aussagen über die Suppression bzw. Verstärkung der Ionisation der Zielanalyte in der Probe gemacht werden.

Für die Bestimmung wird ein T-Stück zwischen dem HPLC-System und dem Massenspektrometer eingesetzt. Eine Standardlösung der Analyte wird kontinuierlich über eine Spritzenpumpe in den Eluentenstrom infundiert. Dies resultiert in einer stabilen Basislinie, die im Vergleich zur normalen Basislinie um die Analytkonzentration erhöht ist. Eine entsprechend aufgereinigte Matrixprobe ohne Analyte wird in das HPLC-System injiziert. Interferierende Matrixsubstanzen werden durch das Verursachen von Störungen in der Basislinie des Infusionschromatogramm erkannt. Eine schematische Darstellung der Nachsäulen-Infusionstechnik zeigt Abbildung 19.

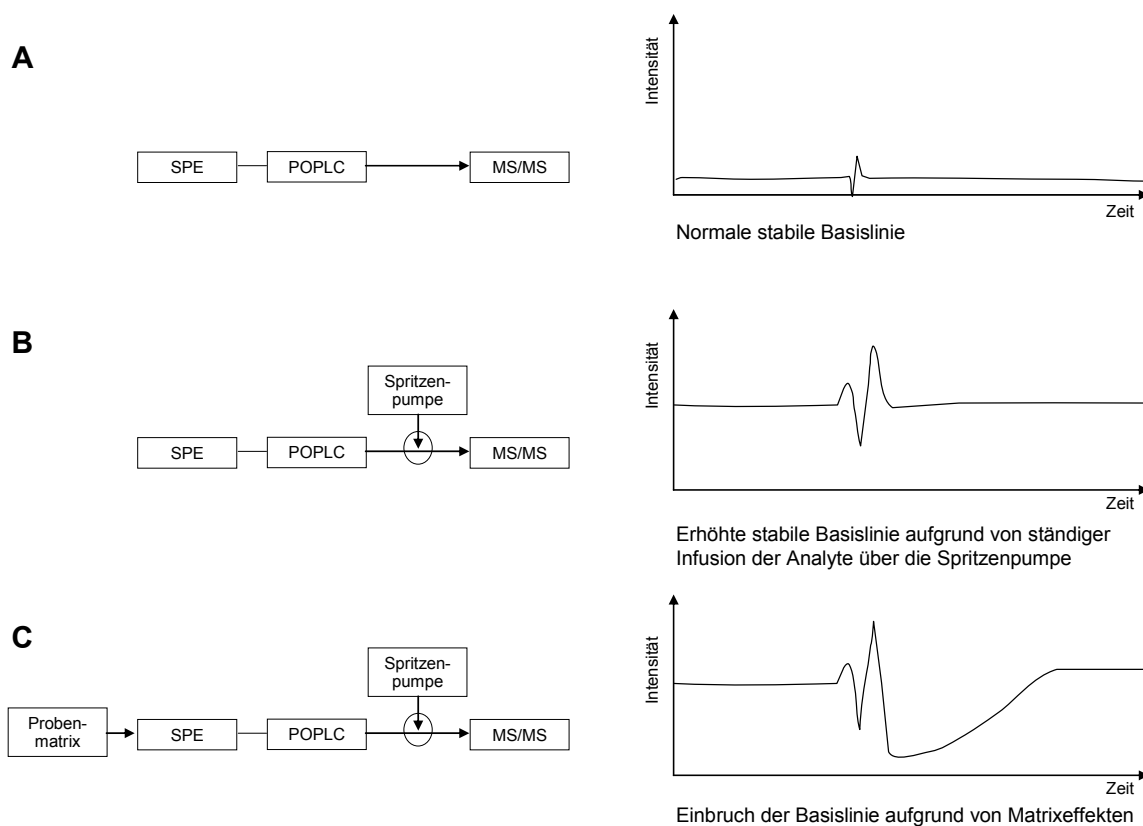


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Bestimmung von Matrixeffekten mit der Nachsäulen-Infusionstechnik.

A) Stabile Basislinie vor und nach dem Injektionspeak

B) Erhöhte stabile Basislinie aufgrund von ständiger Infusion der Analyte über die Spritzenpumpe vor und nach dem Injektionspeak

C) Einbruch der stabilen Basislinie nach dem Injektionspeak aufgrund von Matrixeffekten.

Weitere Methoden sind der Vergleich des Analyt-/Matrixverhältnisses und der Vergleich von Steigungen der Standardkurven [147-148]. Der relative Matrixeffekt kann durch den Vergleich von Proben verschiedener Herkunft gezeigt werden [56].

Die Bestimmung von Phospholipiden kann durch Erweiterung der MS-Methode auf Phospholipid-selektive Massenübergänge erfolgen. Eine allgemeinere Methode wurde von Little et al. unter dem Namen „in-source collisionally induced dissoziation“ beschrieben [141]. Dabei wird nur das Fragment Trimethylammoniummethylphosphation detektiert, das durch hohe Cone-Energie aus mono- und disubstituierten Glycerophosphocholinen entsteht. Es ist in Abbildung 20 abgebildet.

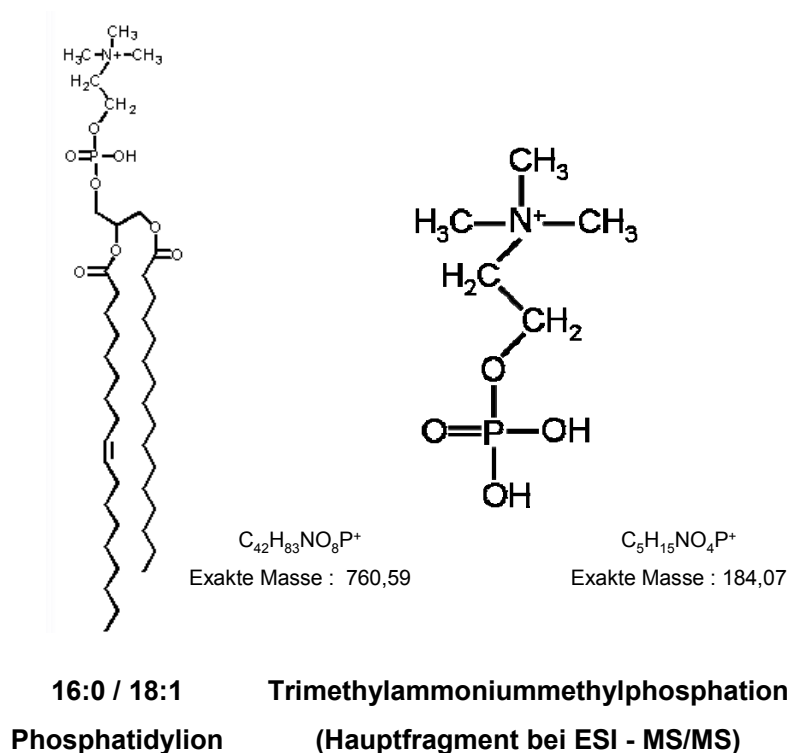


Abbildung 20: Trimethylammoniummethylphosphation. Hauptfragmention bei der Bestimmung der Phospholipide durch „in-source collisionally induced dissoziation“, hier am Beispiel des Phosphatidylions (16:0/18:0).

Der erste und dritte Quadrupol werden dazu auf ein Masse/Ladungsverhältnis von 184 gestellt. Damit es in der Kollisionszelle zu möglichst keiner Veränderung des Bruchstückes kommt, wird eine sehr niedrige Kollisionsenergie gewählt. Vorteil dieser Methode ist, dass auch ein weiterer kleinerer Anteil der Phospholipide, nämlich die Sphingomyeline über dasselbe Masse/Ladungsverhältnis detektiert werden kann. Mit dieser Methode nicht erfassbar sind die Glycerophosphoethanolamine und die Glycerophosphoserine. Diese können nur in einem separaten, weniger sensitiven Experiment durch ein Neutralteilchenscan detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Untersuchungen mit Nachsäuleninfusionschromatogrammen vorgenommen. Phospholipide wurden in einer gemeinsamen MRM-Methode mit den Immunsuppressiva bestimmt.

2.3.5.4 Lösungsansätze zur Eliminierung von Matrixeffekten

Matrixeffekte können quantitativ bestimmt und in die Ergebnisse mit Korrekturfaktoren eingerechnet werden. Jedoch ist diese Art der Bestimmung des Ausmaßes der Effekte an sich eher unzuverlässig. Darüber hinaus macht es die intra- und interindividuelle Variabilität von biologischen Flüssigkeiten erforderlich, Matrixeffekte möglichst vollständig zu eliminieren.

Dafür gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten: eine möglichst selektive Probenaufbereitung und/oder verbesserte chromatographische Bedingungen [135, 149]. Der Nachteil verbesserter chromatographischer Bedingungen besteht jedoch darin, dass die Zielanalyte nur von den detektierten endogenen Substanzen abgetrennt werden. Die Effizienz der Ionisation der Analyte kann jedoch immer noch durch nicht detektierte endogene Substanzen beeinflusst werden [56].

Die einzig zuverlässige Möglichkeit, die interferierenden Matrixeffekten zu eliminieren, ist eine Analyt-spezifische Aufbereitungsmethode [150]. Dabei hilft jeder weitere Aufreinigungsschritt, um eine reinere Matrix zu erhalten. Gleichzeitig sollten dabei jedoch auch andere Faktoren bei der Methodenentwicklung abgewogen werden. So muss für jede Analyse das beste Verhältnis zwischen dem Aufreinigungsgrad, der Schnelligkeit der Analyse und dem Kostenfaktor gefunden werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Probenaufbereitung mit SPE-Technologie zu sehr reinen Proben mit schwacher bis vernachlässigbaren Matrixeffekten führen kann (<15%) [151]. Bis jetzt war eine effiziente, SPE-basierte Probenaufbereitung jedoch mit vielen manuellen Schritten verbunden. Vorteil einer SPE-Aufreinigung ist sicherlich die Aufkonzentrierung der Zielanalyte. Beachtet werden muss dabei aber auch, dass die interferierenden Substanzen ebenfalls aufkonzentriert werden [127]. Georgi et al. konnten erstmals zeigen, dass Matrixeffekte in biologischen Flüssigkeiten durch multidimensionale, SPE-basierte

Aufreinigung on-line eliminiert werden können [80]. Deng et al. konnten zeigen, dass Matrixeffekte durch orthogonale Separation erheblich vermindert werden konnten [152].

Um Matrixeffekte, die durch Phospholipide hervorgerufen werden zu vermeiden, wurden mehrere Strategien verfolgt: darunter die chromatographische Abtrennung der Zielanalyte von den Phospholipiden, die selektive Extraktion durch beispielsweise SPE oder Proteinpräzipitation und die Anwendung verschiedener Metallsorbentien, wie beispielsweise Zirkoniumverbindungen [142]. Auch Benett et al. haben gezeigt, dass eine Elimination der Phospholipide durch eine effektive Probenaufbereitung zu präferieren ist [144]. Falls Matrixeffekte nicht chromatographisch eliminiert werden können, kann ein Interner Standard herangezogen werden.

2.3.6 Anwendung eines Internen Standard in der Bioanalytik

Interne Standards werden in HPLC-MS/MS-Methoden zur Kompensierung von Probenunterschieden und –verlusten und zum Ausgleich der Extraktions- und Ionisationseffizienz eingesetzt [153]. Dabei basiert die Methode auf einem Vergleich der Intensitäten des Signals des Analyten mit dem der Referenzsubstanz (Interner Standard). Durch diese Methode können zahlreiche Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Instrumentelle Änderungen können dann vernachlässigt werden, da diese nur die absoluten Signale, nicht aber das Verhältnis von Zielanalyt zu Internem Standard beeinflussen [154].

Da das Ausmaß an Ionensuppression aufgrund von Matrixeffekten von der chemischen Struktur des Analyten abhängig ist, gilt folgender Zusammenhang: Je ähnlicher der Interne Standard dem zu quantifizierenden Molekül chemisch und physikalisch ist, desto ähnlicher sind auch die Verluste bei der Probenaufbereitung, seine Ausbeute beim Ionisationsprozess und sein Fragmentierungsprozess [154]. Deswegen sollte der Interne Standard so ausgewählt werden, dass er dem Zielanalyt chemisch möglichst ähnlich ist. Er wird der Probe hinzugefügt und wird sich im besten Falle genauso verhalten wie der Zielanalyt. Die Ionisation beider Substanzen werden dann, unabhängig vom Zeitpunkt der Elution, in gleichem Maße durch

Matrixsubstanzen beeinflusst. Das Verhältnis der Peakflächen wird sich dabei nicht ändern, und die Analytkonzentration kann berechnet werden.

Bei der Auswahl eines Internen Standards gibt es drei verschiedene Klassen:

- Isotopen-markierter Zielanalyt,
- strukturelles Analogon des Analyten und
- anderes, strukturell dem Analyten ähnelndes Molekül, welches darüber hinaus ähnliche chromatographische und ionisierende Charakteristika aufweist.

Diese wurden für einen der Zielanalyten der vorliegenden Arbeit, dem Ciclosporin erstmals von Taylor et al. evaluiert [155]. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass deuteriertes Ciclosporin A (isotopen markierter Zielanalyt) die besten Resultate ergab. Des Weiteren waren die Ergebnisse mit Ciclosporin D (strukturelles Analogon) als Interner Standard den Ergebnissen mit Ascomycin (strukturell dem Analyten ähnliches Molekül) als Internem Standard überlegen. Obwohl auch Ciclosporin D sehr gute Ergebnisse lieferte, kam es bei seiner Verwendung in Analysen mit hohem Durchsatz schnell zu falschen Ergebnissen. Diese werden auf Interferenzen von Ciclosporin A Metabolite zurückgeführt. Streit et al. zeigten, dass mehrere Ciclosporin A-Addukte, die beim Ionisationsprozess gebildet werden, isobar zu Ciclosporin D sind [156].

Heute werden Isotopen-markierte Interne Standards aufgrund der besseren Ergebnisse allgemein favorisiert. Dabei wird angenommen, dass das Verhältnis des Analyten zum Internen Standard nicht beeinflusst wird [56, 155, 157-158]. Vorteile sind die ähnliche Ionisationsausbeute, Fragmentation, Retentionszeit und die absolute Wiederfindung. Jedoch sind derartige Standards nicht für alle Pharmaka erhältlich [157]. Darüber hinaus sind die für eine selektive Massendetektion besser geeigneten ^{13}C -, ^{15}N - oder ^{17}O -markierten Verbindungen sehr teuer [154].

Da ein Zielanalyt und sein stabiler Isotopen-markierter Interner Standard theoretisch coeluierten, ist es wichtig, dass der Massenunterschied zwischen den beiden Verbindungen mindestens drei Masseneinheiten beträgt. Ansonsten können die Substanzen im Massenspektrometer nicht korrekt voneinander getrennt werden und es entsteht „Cross-talk“ [154]. Ebenfalls konnten Jemal et al. zeigen, dass eine Coelution nur bei einer sehr sauber aufgereinigten Probe sinnvoll ist [159]. Sancho et al. konnten zeigen, dass bei sauber

aufgereinigten Proben aber auch ein strukturelles Analogon verwendet werden kann [160]. Nachteilig sind dabei nur der unterschiedliche Ionisationsgrad und die Retentionszeit.

2.3.7 Massenkalisierung in der Massenspektrometrie

Um die Sensitivität bei der Detektion mit einem Massenspektrometer zu steigern, wird eine Massenkalisierung, ein „Tuning“ durchgeführt. Das „Tuning“ ist gerätespezifisch. Dabei werden verschiedene Quellenparameter auf die Zielanalyte so eingestellt, dass die Ionisations- und Fragmentationseffizienz maximal ist. Einer Justierung unterliegen dabei folgende Parameter: die Werte für den Quadrupol, die Fokussierungslinse, der Sekundär-Elektronen-Vervielfacher, die Massenachse und die Peakbreite.

Im Vorfeld werden der Ionisationsmodus und die Flussrate festgelegt. Für die Muttersubstanz sind die wichtigsten Parameter, die Cone- und die Kapillarspannung einzustellen und die Quelltemperatur, die Desolvatationstemperatur, die Ionenspannung und die LM/HM-Auflösung zu optimieren. Die Optimierung erfolgt auf das Signalmaximum. Nach erfolgreichem „Tuning“ der Muttersubstanz erfolgt die Parametereinstellung der Tochtersubstanz. Die Ermittlung der Tochtersubstanz ergibt sich bei angelegter Kollisionsspannung aus dem höchsten Fragmentensignal. Für diese Tochtersubstanz ist ihr spezifischer Parameter, die Kollisionsenergie einzustellen und die Eingangs-, die Ausgangs-, die Ionenenspannungen und die LM/HM-Auflösung zu bestimmen.

2.4 Immunsuppressiva

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung einer instrumentellen Plattform für die vollautomatisierte LC-MS/MS Analyse in Vollblut. In diesem Zusammenhang wurden

Immunsuppressiva als Modellanalyte verwendet. Diese Pharmaka sind an Erythrozyten gebunden und müssen daher im Vollblut bestimmt werden [161].

Immunsuppressiva sind Substanzen, die pathologische Immunreaktionen unterdrücken. Sie werden gegen die Abstoßung transplantierte Organe, bei Autoimmunkrankheiten oder pathologischen Immunreaktionen eingesetzt [162]. In der immunsuppressiven Therapie werden Ciclosporin, Tacrolimus, Pimecrolimus, Sirolimus, Everolimus, Glucocorticoide, Zytostatika sowie monoklonale und polyklonale Antikörper eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden Ciclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus aus der Gruppe der Immunsuppressiva gewählt. Für jeden Analyten wurde ein strukturelles Analogon als Interner Standard verwendet. Der Grund dafür ist, dass alle Analyten in der ausgearbeiteten Methode gleichzeitig quantifiziert werden sollen. Bekannt ist, dass es bei simultaner Quantifizierung mehrerer Analyte unterschiedlicher Polarität notwendig sein kann, mehrere Interne Standards zu verwenden [149]. Alle untersuchten Immunsuppressiva besitzen eine sehr lipophile Struktur und sind daher in organischen Lösemitteln gut löslich. In Wasser sind sie dagegen praktisch unlöslich. Ciclosporin A ist pH-neutral. Tacrolimus ist zwar in festem Zustand stabil, neigt aber unter alkalischen Bedingungen zu degradieren. Sirolimus liegt in Lösung als Gemisch von zwei isomeren Formen vor. In niedriger bzw. neutraler pH-Pufferlösung wird es jedoch schnell degradiert. Everolimus zeigt eine etwas bessere Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Sirolimus. Weitere Eigenschaften der Immunsuppressiva und ihre Strukturformeln sind in Anhang 1 und Anhang 2 aufgeführt.

2.4.1 Pharmakodynamik der Immunsuppressiva

Pharmakodynamik ist die Lehre von der Beeinflussung biologischer Funktionen oder Strukturen durch Pharmaka. Sie befasst sich mit der Art der Wirkung, dem Wirkmechanismus, dem Ort der Wirkung, der Wirkstärke und der Wirksamkeit [10].

2.4.1.1 Wirkmechanismus der Immunsuppressiva

Eine Übersicht der Wirkmechanismen der hier beschriebenen Immunsuppressiva zeigt Abbildung 21.

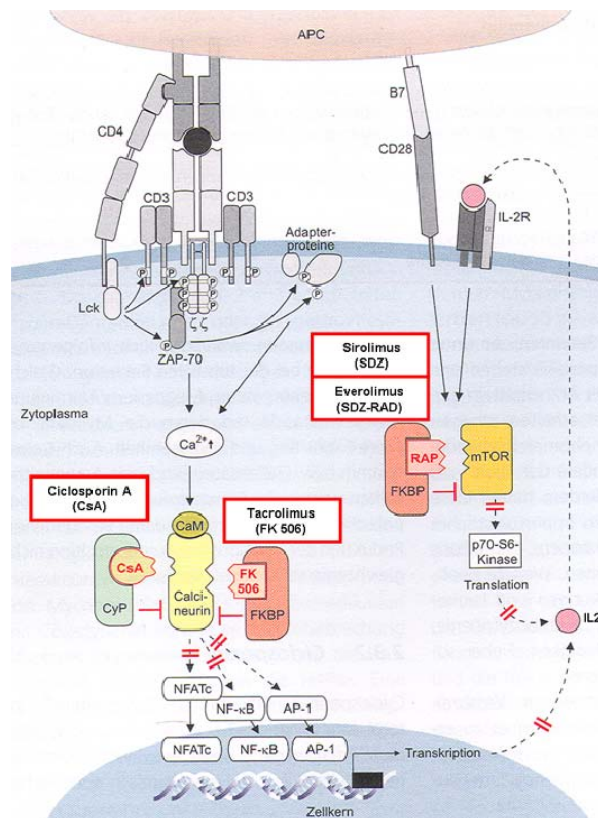


Abbildung 21: Angriffspunkte verschiedener Immunsuppressiva an T-Lymphozyten: Intrazellulärer Signaltransduktionsweg und Inhibitionsmechanismus von Cyclosporin A (CsA), Tacrolimus (FK 506), Sirolimus (RAD) und Everolimus (SDZ-RAD) [163].

Sie gehören zu der Gruppe der Immunophilinen und besitzen einen selektiven Wirkungsmechanismus. Sie hemmen die Proliferation aktivierter T-Lymphozyten über eine veränderte Proteinfaltung, indem sie spezifisch und reversibel die Interleukin-2 Freisetzung (IL-2) aus T-Lymphozyten inhibieren. So können diese nicht zu zytotoxischen Zellen ausreifen. Das Wirkungsprinzip beruht auf ihrer Bindung an Rotamasen. Rotamasen sind Enzyme, die die räumliche Anordnung von Peptidgruppen und damit die Faltung von Proteinen katalysieren. Die für die Immunophilinen relevanten Faltungsenzyme stammen aus den Familien der Cyclophilinen bzw. der FK506 Bindungsproteine (FKBP). Alle Modellanalyte

bilden mit ihnen Komplexe [164]. Jedoch wird an dieser Stelle zwischen Calcineurin-Inhibitoren und den mammalian target of Rapamycin (m-TOR)-Inhibitoren unterschieden.

Calcineurin-Inhibitoren

Nach Eintritt in die T-Lymphozyten bindet Ciclosporin mit hoher Affinität an das zytosolische Protein Cyclophilin. Der Ciclosporin/Cyclophilin-Komplex hemmt dann die Calcium-abhängige Protein-Phosphatase-Aktivität des Calcineurin-Calmodulin-Komplexes. In aktivierten Immunzellen aktiviert dieser Komplex unter normalen Bedingungen den nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NF-AT) durch Dephosphorylierung im Zytoplasma [165]. Ohne Abspaltung der Phosphatgruppen kann NF-AT nun nicht in den Zellkern translozieren. Als Folge unterbleibt die nachgeschaltete Expression zahlreicher proinflammatorischer Proteine wie IL-2 und seines Rezeptors, die für die Induktion der Synthese von Zytokinen in T-Lymphozyten notwendig sind [166].

Die Zellspezifität des am stärksten betroffenen Transkriptionsfaktors NF-AT kommt praktisch nur in T-Lymphozyten vor. Daher erklärt sich die weitgehende Selektivität, so dass beispielsweise die bakterielle Abwehr des Organismus nur wenig beeinflusst wird. Ciclosporin A vermindert die Anzahl von Thymozyten und die Bildung von T-Lymphozyten im Thymus [166].

Der Wirkmechanismus von Tacrolimus gleicht dem von Ciclosporin A. Seine Wirkstärke ist jedoch 10-100-mal potenter [167]. Dies resultiert aus der Bindung von Tacrolimus an ein anderes Immunophilin, dem FK-Bindungsprotein-12 (FKBP-12). Dadurch wird die Bildung von Lymphokinen (wie IL-2, 3 und γ -Interferon, TNF- α sowie die Expression des IL-2-Rezeptors) gehemmt.

Darüber hinaus unterdrückt Tacrolimus die Aktivierung der T-Zellen und die von den T-Helferzellen abhängige Proliferation der B-Zellen nicht nur indirekt, sondern auch direkt durch die Aktivierung der B-Zellen über die TNF- α -Gentranskription. Tacrolimus inhibiert proliferative und zytotoxische Antworten und unterdrückt Antikörperantworten [168].

mTOR-Inhibitoren (Mammalian target of Rapamycin)

Sirolimus und Everolimus sind relativ neue Substanzen. Deswegen ist deren Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt.

Sirolimus und Everolimus zählen zu der Gruppe der mTOR-Inhibitoren. Obwohl sie an dasselbe Immunophilin wie Tacrolimus binden, hemmt dieser Komplex die Kinase mTOR. Dadurch werden sowohl Zellzyklus als auch Zellproliferation beim Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase gehemmt. Diese sind Calcium-unabhängig [164].

Des Weiteren blockieren Sirolimus und Everolimus die Proliferation von T- und B-Lymphozyten. Sie hemmen das T-Zell Wachstum und blockieren die progressiv ablaufenden molekularen Vorgänge im Zuge des Zellzyklus. Sirolimus blockiert die IL-2-abhängige oder –unabhängige Proliferation stimulierter humaner B-Lymphozyten. Zusätzlich wird die Differenzierung Antikörper-bildender Zellen mit konsekutiver Abnahme der IgM-, IgG- und IgA-Produktion gehemmt. Die Zellzyklus-hemmende Wirkung von Sirolimus ist nicht nur bei Lymphozyten beobachtet worden, sondern ist auch bei Tumorzellen und glatten Gefäßmuskeln nachweisbar [167].

2.4.1.2 Anwendung und Dosierung von Immunsuppressiva

Neben dem Einsatz nach Organtransplantationen und bei Autoimmunkrankheiten werden Immunsuppressiva auch bei chronischer Glomerulonephritis mit nephrotischem Syndrom, chronisch entzündlicher Darmerkrankung, Myastenia gravis, Autoimmunhepatitis, entzündlich rheumatischen Erkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) und thrombopenischer Purpura eingesetzt [10].

Die Dosierung aller Immunsuppressiva nach Organtransplantation beinhaltet eine individuelle Einstellung jedes Patienten auf seine spezielle Situation. Dies resultiert aus der Wichtigkeit der Vorbeugung der Abstoßung des Transplantates, den erheblichen Nebenwirkungen und der starken inter- und intraindividuellen Pharmakokinetik [169]. Die angegebenen Werte sind demnach nur als Richtwerte zu sehen. Die richtige Dosierung wird durch die Therapeutische Arzneimittelüberwachung der Talspiegel in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

Nach einer Organtransplantation wird in der immunsuppressiven Therapie zwischen einer Induktionstherapie bis zu drei Monaten nach Operation und einer lebenslangen Erhaltungstherapie unterschieden. Dabei werden verschiedene Faktoren berücksichtigt. Grundsätzlich werden verschiedene Konzentrationen in Abhängigkeit des transplantierten Organs empfohlen. Weitere Faktoren sind Alter, Geschlecht, Herkunft, Gesundheitszustand und Vorerkrankungen des Patienten. Beispielsweise haben Kinder und Afro-Amerikaner für gewöhnlich eine erhöhte Clearance und bedürfen deswegen einer höheren Dosierung [169-171]. Patienten mit Leberschädigung, Patienten mit niedrigen Lipoproteinkonzentrationen und ältere Patienten haben dagegen häufig eine geringere Clearance [166]. Mancinelli et al. konnten zeigen, dass Tacrolimus von unterschiedlichen ethnischen Bevölkerungsgruppen verschieden stark bioverfügbar ist. Dies ist auf unterschiedliche Expressierung von CYP 3A und P-Glykoprotein zurückzuführen [172].

Wegen ihrer synergistischen Wirkung werden Sirolimus und Everolimus auch gerne in Kombinationstherapie mit Ciclosporin A gegeben [173-178]. Zusammen werden geringere Abstoßungsrate des transplantierten Organs [179-180] und bessere Verträglichkeit des Patienten beobachtet [178, 181-182]. Ein grobes Dosierschema ist in Anhang 3 dargestellt.

2.4.1.3 Nebenwirkung der Immunsuppressiva

Obwohl die Immunsuppressiva einen relativ spezifischen Wirkungsmechanismus aufweisen, kommt es zu erheblichen unerwünschten Begleiterscheinungen.

Wenn eine Immunreaktion medizinisch unerwünscht ist, wäre eine gezielte Ausschaltung der spezifisch reagierenden Lymphozyten durch Rezeptor-Antagonisten die beste Therapie. Dies ist aufgrund der großen Diversität (größer 10^8) der Lymphozyten mit unterschiedlichen spezifischen Antigenrezeptoren jedoch nicht anwendbar. Für eine Immunsuppression bedeutet dies, dass Lymphozyten antigenunspezifisch ausgeschaltet werden müssen. Sie stellt daher immer einen schwerwiegenden Eingriff dar, weil neben der erwünschten Wirkung, wie dem Erhalt eines Transplantats, unvermeidlich auch lebensnotwendige Abwehrleistungen betroffen

sind. Die Folge kann eine verminderte Abwehr von Infektionen mit im Extremfall tödlichem Ausgang sein [183].

Ciclosporin A

Ciclosporin A besitzt ein typisches Nebenwirkungsprofil. Eine bedeutsame Nebenwirkung ist die dosisabhängige reversible Nierenschädigung. Ebenfalls dosisabhängig werden reversible Störungen der Leberfunktion, Neurotoxizität (Tremor, Kopfschmerzen, Krampfanfälle, unterschiedliche Parästhesien an den Gliedmaßen, Manien und Depressionen), Kardiotoxizität, mukokutane kosmetische Veränderungen (Hirsutismus, Hypertrichose, Gingivahyperplasie), Stoffwechselstörungen (Hyperkaliämie, Hypomagnesiämie), gastrointestinale Störungen, hämatologische Effekte und Ödeme beobachtet. Bei Langzeittherapie kann es auch zu Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Hyperlipidämie, Fettsucht, Hyperurikämie und Diabetes mellitus kommen [10, 167].

Tacrolimus

Die Nebenwirkungen gleichen denen von Ciclosporin A mit Ausnahme von Gingivahyperplasie und Hirsutismus. Dafür wurden neurotoxische Symptome, Kardiomyopathien und depressive Zustände sowie Schlaf- und Traumstörungen beobachtet [10]. Tacrolimus durchquert auch die Plazentaschranke.

Sirolimus und Everolimus

Die häufigsten Nebenwirkungen sind Ödeme, Lymphozelen, Diarrhö, Anämie, Thrombozytopenie, Leukozytopenie, Hypercholesterinämie, Hyperlipidämie, Hypophosphatämie und Hypokaliämie. Daneben wurden Infektionen der Harnwege, Algodystrophien, Arthralgien, Leberfunktionsstörungen, Lymphocele und Wundheilungsstörungen beobachtet [10]. Eine schwerwiegende Komplikation unter Sirolimus-Therapie ist die Lungentoxizität. Die Entwicklung einer Anämie ist wahrscheinlich die schwerwiegendste Sirolimus-induzierte hämatologische Komplikation. Die Anämie ist nicht regenerativ. Ein deutlicher Vorteil gegenüber den Calcineurininhibitoren ist die fehlende Nephro- und Neurotoxizität. Weiterhin zeigt Sirolimus ausgeprägte antineoplastische Wirksamkeit.

Tierstudien haben reproduktionstoxische Effekte einschließlich Embryo-/Fetotoxizität ergeben. Es ist nicht bekannt, ob Everolimus in die Muttermilch übergeht.

2.4.1.4 Interaktionen der Immunsuppressiva

Bei allen in dieser Arbeit eingesetzten Immunsuppressiva ist das potenzielle Auftreten von Arzneimittelinteraktionen von hoher klinischer Relevanz. Nicht selten erhalten Transplantationspatienten neben Immunsuppressiva eine Vielzahl anderer Arzneimittel wie Antibiotika, Psychopharmaka, Antihypertensiva und lipidsenkende Arzneimittel. Interaktionen sind dann von Bedeutung, wenn sich die Wirksamkeit oder Toxizität eines Arzneistoffs durch die Gabe eines anderen Arzneistoffs ändert. Dies kann durch Beeinflussung der Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik geschehen [184].

Alle vier Immunsuppressiva werden hauptsächlich über das Cytochrom P450 (CYP 3A) in der Leber und im kleinen Interstitium metabolisiert. Zusätzlich sind sie Substrate und/oder Inhibitoren des P-Glykoproteins [185]. Zusammen mit der CYP-Unterfamilie spielt es in der apikalen Membran von Enterozyten bei deren intestinalen Resorption eine entscheidende Rolle [184]. Diese beiden Faktoren bedingen überwiegend die Interaktionen.

Für Ciclosporin A wurden drei klinisch relevante Arzneimittelinterferenzen identifiziert [171]. Zum einen darf es nicht zusammen mit nephrotoxischen Substanzen wie Aminoglykoside, Amphotericin B und Ciprofloxacin verabreicht werden. Des Weiteren werden Interferenzen mit Arzneimitteln, die über das Enzym Cytochrom-P450-Isoenzym 3A4 (CYP 3A4) metabolisiert werden, beobachtet. Da Ciclosporin A über dasselbe Enzym metabolisiert wird, bewirkt eine oral applizierte Comedikation mit Induktoren des Enzyms eine verlangsamte Metabolisierung, während es mit Inhibitoren des Enzyms zu einer beschleunigten Metabolisierung kommt. Für Tacrolimus besteht eine ausgesprochene Neuro- und Nephrotoxizität. Daher sollte es nicht mit Ganciclovir, nichtsteroidalen Entzündungshemmern, Antibiotika und Chemotherapeutika gegeben werden. Everolimus wird zusätzlich noch über das Enzym CYP 2D6-System verstoffwechselt.

Von größerer Bedeutung sind Interaktionen mit möglichen immunsuppressiven Kombinationstherapeutika. Eine gleichzeitige Gabe zusammen mit Tacrolimus wird routinemäßig nicht empfohlen, da Tacrolimus die Pharmakokinetik von Ciclosporin durch eine kompetitive Interaktion mit CYP 3A4 beeinflusst [186]. Daraus resultieren beispielsweise eine verlängerte Halbwertszeit und ein additiv nephrotoxischer Effekt. Die biologische Aktivität von Sirolimus und Everolimus ist synergistisch zu Ciclosporin A und Tacrolimus [174, 182]. Eine gemeinsame Gabe kann demnach die Toxizität herabsetzen. Aus diesem Grund werden sie häufig in Kombination gegeben. Dabei wird die Sirolimus-/ bzw. Everolimus-Metabolisierung durch Ciclosporin A gehemmt.

Weitere bedeutende Interaktionen sind im Anhang 5 tabellarisch aufgeführt.

2.4.2 Pharmakokinetik der Immunsuppressiva

Die Pharmakokinetik beschreibt die Konzentration eines Arzneimittels im Organismus im zeitlichen Ablauf und stellt die dabei gewonnenen Erkenntnisse in einen klinisch-pharmakologischen Zusammenhang. Die Pharmakokinetik umfasst alle Vorgänge der Freisetzung, Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Elimination.

Immunsuppressiva besitzen eine komplizierte Pharmakokinetik. Inkomplette orale Absorption, First-pass Metabolismus, hohe Proteinbindung, Bindung an Erythrozyten, große Verteilungsvolumina, extensive Metabolisierung und biläre Exkretion machen die Kontrolle schwer [187]. Allgemein wird die Resorption von Immunsuppressiva insbesondere von fettreicher Nahrung beeinflusst. Darüber hinaus wird sie durch eine Reihe von Ereignissen abgeschwächt. Dazu zählen ein verminderter Gallenfluss, verzögerte Magenentleerung, intestinale Motilitätsstörungen, beschleunigte Magen-Darm-Passage und Verringerung der Resorptionsfläche.

Ciclosporin A

Die Resorption von Ciclosporin A erfolgt vorzugsweise im oberen Intestinaltrakt. Durch den Einfluss des Enzyms Cytochrom P450-3A4 und des P-Glykoproteins beträgt die Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation, abhängig von der galenischen Zubereitung, nur 20-50% [10]. Die Verteilung von Ciclosporin A erfolgt nach einem temperaturabhängigen Äquilibrium, nachdem ungefähr 50% der Substanz an Erythrozyten, 10% an Leukozyten und 30-40% an Plasmaproteine gebunden sind. Nur 1-6% des Ciclosporin A's sind normalerweise frei verfügbar [167]. Ciclosporin A reichert sich wegen seiner Lipophilie rasch in Geweben und Organen an. Dagegen überwindet die Substanz nur schwerlich die Blut-Hirn-Schranke bzw. die Plazentaschranke [167]. Die Verteilung von Ciclosporin A in Blut und Plasma wird letztlich durch hohe Plasmakonzentrationen und durch CsA-bindende Proteine im Plasma beeinflusst. Der Einfluss des Hämatokrits auf die Verteilung wird kontrovers diskutiert, erscheint aber eher gering [188-189].

Im Organismus wird Ciclosporin A nahezu quantitativ metabolisiert. Die Metabolisierung erfolgt unter dem Einfluss des Enzyms CYP 3A4 und des P-Glykoproteins. Ein maximaler Blutspiegel wird nach 1,5-2 Stunden gemessen [190]. Die Halbwertszeit liegt zwischen 6 und 16 Stunden. Die Ausscheidung der Metaboliten erfolgt bilär und renal.

Tacrolimus

Die Resorption von Tacrolimus nach oraler Gabe erfolgt im Magen-Darm-Trakt. Die orale Bioverfügbarkeit ist mit 4-89% sehr variabel. Eine maximale Blutkonzentration wird nach 1-2 Stunden gemessen [191]. Die Substanz wird nahezu vollständig hepatisch biotransformiert [192]. Tacrolimus ist mit 83% überwiegend an Erythrozyten gebunden [193]. Die Blutkonzentration liegt dabei 15-35 mal höher als im Plasma [167]. Im Gegensatz zu Ciclosporin A ist die Bindung an Erythrozyten vom Hämatokrit [194], und die ungebundene Plasmafraktion vom α_1 -sauren Glykoprotein und vom HDL-Cholesterin abhängig [195]. Die Verteilung von Tacrolimus zwischen Erythrozyten und Plasma erfolgt recht schnell und ist temperaturabhängig [196-197]. Im Plasma ist Tacrolimus zu ungefähr 99% an Protein gebunden [192]. Die Substanz verteilt sich in hohen Konzentrationen im Organismus in nahezu allen Geweben, darunter in Lunge, Leber, Milz, Herz und Pankreas. Es durchbricht die Plazentaschranke, jedoch nicht die Blut-Hirnschranke. Es unterliegt einer ausgiebigen

Verstoffwechselung primär in der Leber, weniger ausgeprägt in den Zellen der Darmwandmukosa. Katalysiert wird es durch das CYP450 3A4 [167]. Es bildet 8 Metabolite, von dem einer dem Tacrolimus vergleichbare immunsuppressive Potenz besitzt [198]. Die Plasmaeliminationshalbwertszeit liegt zwischen 4 und 60 Stunden [191]. Die Elimination erfolgt zu über 90% über die Fäzes.

Sirolimus

Die Resorption von Sirolimus erfolgt rasch aus dem Magen-Darm-Trakt. Die orale Bioverfügbarkeit ist aufgrund von CYP 3A4 und P-Glykoprotein sehr variabel. Die Resorption wird beträchtlich von der Nahrung beeinflusst [199]. Nach Aufnahme in das Blutkompartiment erfolgt die Verteilung von Sirolimus temperatur- und konzentrationsunabhängig. Sirolimus bindet zu 94,5% an Erythrozyten sowie zu je 1% an Lymphozyten und an Granulozyten. Die Verteilung an plasmatische Blutkompartimente ist geringer und liegt bei 3%. Im Plasma sind ca. 40% an Lipoproteine gebunden. [200]. Sirolimus unterliegt einer extensiven oxidativen Verstoffwechselung. Es bildet 7 Hauptmetabolite mit nur wenig immunsuppressiven Eigenschaften. Die Plasmaeliminationshalbwertszeit ist mit 50-80 Stunden sehr langsam. Die Ausscheidung erfolgt zu über 90% über die Fäzes [167].

Everolimus

Die orale Bioverfügbarkeit von Everolimus ist größer als bei Sirolimus. Zusammen mit Ciclosporin A ist sie nochmals erhöht. Everolimus bindet zu 75% an Erythrozyten. Im Plasma bindet es zu 75% an Plasmaproteine [201]. Die Substanz wird erheblich metabolisiert. Sie ist ein Substrat des Cytochroms CYP450 3A4 und des P-Glykoproteins. Die Ausscheidung erfolgt zu etwa 80% über die Fäzes [167]. Weitere pharmakokinetische Daten sind in Anhang 6-Anhang 8 zusammengestellt.

2.4.3 Therapeutische Arzneimittelkontrolle (Therapeutic Drug Monitoring, TDM)

2.4.3.1 Definition TDM

Unter Therapeutischer Arzneimittelkontrolle wird die Bestimmung von Plasmaspiegeln mit dem Ziel, Informationen über die individuelle Pharmakokinetik des betreffenden Patienten zu erhalten und dadurch, falls erforderlich, die Dosierung gezielt einstellen zu können, verstanden [10].

Bei einem TDM wird besonders kritisch auf den Gebrauch einer spezifischen und sensitiven analytischen Methode, auf die Wahl der zu verwendenden Matrix, auf die Identifizierung von Hauptmetaboliten und auf eine enge Dosis-Wirkungsbeziehung geachtet [187]. Außerdem ist die korrekte Interpretation von Messergebnissen erforderlich. Dafür sind Informationen über die Probenzusammensetzung, die Analysenmethode, das Medikationsprofil des Arztes, die Indikationsstellung, die Begleittherapie, die Demographie und der Gesundheitsstatus des Patienten einzubeziehen. Darüber hinaus ist die Reproduzierbarkeit der Wirkstärke zu beachten [187].

In der klinischen Diagnostik werden meistens Talspiegel bestimmt. Des Weiteren ist die Messung der Gesamtexposition (AUC, gemessen als Fläche unter der Zeit-Konzentrationskurve) von Interesse. Für die alltägliche Praxis ist diese Messung allerdings nicht geeignet.

2.4.3.2 Indikationen und Voraussetzungen für ein TDM

Therapeutische Arzneimittelkontrolle soll bei schwierig zu analysierenden Arzneimitteln helfen, Informationen über die adäquate Dosierung zu erhalten und Toxizität zu vermeiden. Diese Kriterien werden bei Wirkstoffen mit enger therapeutischer Breite, großer intra- und interindividueller Variabilität in der Pharmakokinetik, bei Einnahme potenziell interagierender

Medikation, bei therapeutischem Versagen unter Standardmedikation und bei Compliancestudien erfüllt [187].

Arzneimittel repräsentieren nur selten den idealen analytischen Wirkstoff. Wünschenswert ist eine vorhersehbare, leicht und direkt zu messende, dosisabhängige Wirkstoffkonzentration mit unkomplizierter Kinetik, die zusätzlich in einem breiten therapeutischen Wirkungsbereich liegt [187].

Grundsätzlich erscheint die Bestimmung der Serumkonzentration eines Pharmakons für die Steuerung der Therapie sinnvoll. Dies gilt allerdings für Medikamente mit reversiblen Effekt. Des Weiteren muss die Konzentration im Plasma mit der Konzentration am Wirkort (Rezeptor) im Gleichgewicht stehen. Außerdem ist eine stichhaltige Indikation für die Konzentrationsmessung und eine adäquate Bestimmungstechnik erforderlich [202].

Die TDM ist generell bei Substanzen mit einem extrem hohen Verteilungsvolumen nicht anwendbar. Zum Beispiel wandern Substanzen wegen ihrer großen Lipophilie bereits während der Verteilungsphase nahezu vollkommen in ein sogenanntes peripheres Kompartiment ab. Die Wirkung eines solchen Pharmakons kann trotz fehlender Nachweisbarkeit im Plasma weiterbestehen. Ebenso nicht für das TDM geeignet sind Pharmaka, die zu einer Toleranz am Rezeptor führen oder dort irreversible Effekte hervorrufen [202]. Vorteil des TDM ist, dass Interaktionen, die durch Comedikation hervorgerufen werden, relativ gut überwacht werden können. Dagegen sind andere Ereignisse schlecht kontrollierbar, die in eine inter- bzw. intraindividuelle Variabilität der Bioverfügbarkeit resultieren. Dazu gehören beispielsweise ein verminderter Gallefluss, eine verzögerte Magenentleerung, intestinale Motilitätsstörungen, eine beschleunigte Magen-Darm-Passage oder eine Verringerung der Resorptionsfläche.

Der Zeitpunkt der Blutentnahme richtet sich nach der klinischen Fragestellung und ist abhängig von der Pharmakokinetik des zu untersuchenden Medikamentes [202].

2.4.3.3 TDM der Immunsuppressiva

Eine Therapeutische Arzneimittelkontrolle wird primär und fast ausschließlich für Arzneistoffe mit einer engen therapeutischen Breite (Narrow Therapeutic Index Drugs, NTI

drugs) durchgeführt. Auch bei den Immunsuppressiva kann eine 20%ige oder kleinere Dosisänderung bei konstanter Bioverfügbarkeit zu einer klinisch signifikanten und unerwünschten pharmakodynamischen Veränderung führen [203-204]. Bei Immunsuppressiva stellt eine Unterversorgung einen signifikanten Risikofaktor für eine akute Abstoßung des transplantierten Organs dar. Im Gegensatz dazu ist eine zu hohe Dosis mit dem Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Die therapeutische bzw. toxische Antwort eines Arzneistoffes ist dabei allein von der ungebundenen bzw. freien Konzentration im Plasma abhängig. Die totalen Konzentrationen im Plasma oder Vollblut haben darauf keinen Einfluss [205].

Wichtigstes Kriterium für TDM bei Immunsuppressiva ist die Abhängigkeit der Vollblutkonzentration von der Wirkstärke [206-207].

Da die inhomogene Verteilung von Ciclosporin A und Tacrolimus zwischen Plasma und Erythrozyten stark vom Hämatokritwert, der Arzneistoffkonzentration und der Temperatur abhängig ist, wird Vollblut in der Regel als die geeignete Matrix zur Kontrolle empfohlen [208-210]. Nach neueren Richtlinien, in welchen insbesondere die zunehmende Comedikation berücksichtigt wird und in denen die Analytik angepasst wurde, bleibt Vollblut die geeignetste Matrix [211-215]. Darüber hinaus wurde bereits herausgefunden, dass für Wirkstoffe mit einem Blut-zu-Plasma- oder Erythrozyten-zu-Plasma-Verteilungskoeffizienten größer 2,0, eine Analyse aus Vollblut nachweislich eine Sensitivitätssteigerung bedeutet. Ebenso sollte die Analyse aus Vollblut bei Wirkstoffen, die eine signifikante Temperatur-, pH- oder konzentrationsabhängige Verteilung aufweisen, in Erwägung gezogen werden. Jedoch wird die Matrix bis heute nicht immer nach den besten fachlichen Kriterien gewählt [161].

Weiterhin sollten bei der TDM für Immunsuppressiva eine spezifische, sensitive und analytische Methode, eine Artefakte-vermeidende Matrix und die Identifikation von wichtigen Metaboliten im Vordergrund stehen.

Bei der TDM von Ciclosporin A erscheint die Wahl der richtigen Strategie der Arzneimittelkontrolle und ein akkurater Zeitpunkt der Probenentnahme verbesserungswürdig [216-217]. Da es für Ciclosporin A keine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung gibt [169], ist es erforderlich, auf andere Messparameter auszuweichen. Derzeit wird der Talblutspiegel von Ciclosporin A bestimmt. Alternativ kann die Gesamtexposition Aufschluss über andere Möglichkeiten geben. Neuere Erkenntnisse haben gezeigt, dass die tatsächliche

Substanzexposition (AUC) nach Gabe von Sandimmun[®] Optoral am besten mit dem 2-Stunden Wert (C2-Wert) nach Einnahme korreliert [218]. Eine Korrelation von 85% zeigt die deutlich bessere Übereinstimmung. Diesen Erkenntnissen wurde mit dem C2-Monitoring von Ciclosporin A Rechnung getragen.

Tacrolimus zeigt eine gute Dosis-Wirkungsbeziehung. Für Sirolimus und Everolimus wird ebenfalls die Anfangskonzentration (C0-Wert) gemessen [219]. Diese Substanzen unterlagen schon in frühen klinischen Studien einer Art TDM durch validierte analytische Methoden [216].

2.4.4 Analytik der Immunsuppressiva

In der Analytik der Immunsuppressiva ist die Untersuchung der Muttersubstanz aus Vollblut aktueller Standard. Die Methode der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie kombiniert mit der Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) ist die genaueste Methode und ist daher Referenz [210-211, 220-221].

Oellerich et al. haben eine Übersicht über die gebräuchlichen Bestimmungsmethoden für Ciclosporin A bis 1995 publiziert [211, 220]. HPLC-UV-Methoden sind bis Ende des 20. Jahrhundert wissenschaftlicher Standard [222-224]. Tacrolimus und Ciclosporin A weisen Adsorptionsmaxima <200nm auf. Jedoch sind HPLC-UV-Methoden für die Therapeutische Arzneimittelkontrolle von Tacrolimus nicht sensitiv genug [225]. Sirolimus und Everolimus besitzen aufgrund ihrer Trienstruktur Adsorptionsmaxima bei 267nm, 277nm und 288nm. Da jedoch vielfältige molekulare Spezies in diesem Wellenbereich adsorbieren, waren die Extraktionsprotokolle kompliziert und zeitaufwendig.

Derzeit hat die Anzahl an Veröffentlichungen von HPLC-MS/MS Methoden stark zugenommen. Heute wird vor allem auf kleinere Probenvolumina, größere Messbereiche und hohen Probendurchsatz fokussiert [226-232].

Seit 2004 kann Ciclosporin A zusammen mit Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus durch den Einsatz einer on-line SPE als Probenaufbereitung nicht nur genau, sondern auch schnell

und kostengünstig analysiert werden [233]. Die Vorteile von Simultanmessungen sind offensichtlich: niedriger Lösemittelverbrauch, höherer Probendurchsatz und bei Comedikation gleichzeitige vergleichbare Ergebnisse [234]. Derzeitig existieren zahlreiche MS/MS-Methoden mit einer Simultanbestimmung der vier Immunsuppressiva [233, 235-237]. Aufgrund von Wirkstoff-Wirkstoff Interaktionen ist es Trend, dass auch Metabolite mittels LC-MS/MS quantifiziert werden [238-242]. Ein weiterer Grund für die Notwendigkeit der Quantifizierung der Metabolite von Sirolimus, Tacrolimus und Ciclosporin A ist, dass sie immunsuppressive Aktivität zeigen. Einige Ciclosporin A-Metabolite sind sogar toxisch [235].

Die meisten gängigen HPLC-Methoden, die heute zur simultanen Analyse mehrerer Immunsuppressiva verwendet werden, besitzen eines der folgenden Charakteristika: Mehrpunktkalibration, Festphasenextraktion (off-line oder on-line) und analytische Chromatographie [233, 236, 243-244].

In der alltäglichen klinisch-chemischen Praxis haben aber auch Immunoassays ihren Platz gefunden. Dabei kommen monoklonale Antikörper zur Anwendung, welche spezifisch gegen die Muttersubstanz gerichtet sind. Es stehen verschiedene Meßverfahren zur Verfügung, darunter Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay, die Enzym-multiplizierte Immunoassay-technik und der Radioimmunassay. Die HPLC-Analytik ist den Immunoassays jedoch überlegen. Für Ciclosporin A und Tacrolimus zeigen die Immunoassays alle eine geringfügige Kreuzreaktion mit Metaboliten und ergeben daher höhere Werte im Vergleich zur HPLC-Methode [221, 245]. Für Sirolimus und Everolimus gab es lange keine Immunoassays. Der Immunoassay, mit dem Sirolimus in klinischen Studien gemessen wurde, ist mittlerweile nicht mehr auf dem Markt verfügbar [246]. Weiter ist nachteilig, dass keine Simultanmessungen möglich sind. Ebenso ist der hohe Zeitaufwand für die Entwicklung eines kommerziell erhältlichen Immunoassays von Nachteil. Deswegen wird der Trend weiter zu den HPLC-MS/MS Methoden gehen.

Die Vorteile einer HPLC-MS/MS Methode sind die hohe Sensitivität, Spezifität, simultane Bestimmung mehrerer Analyte und die schnellere Methodenentwicklung und Analysenzeit [247]. Des Weiteren ist die Präzision in niedrigen Konzentrationsbereichen höher und es besteht ein breiterer/linearer Messbereich [248]. Nachteilig sind die hohen Kosten für die Gerätebeschaffung und die hohen Anforderungen an die Ausbildung bzw. Qualifizierung des Personals [247]. Außerdem wird für Analysen aus Vollblut eine aufwendige Probenaufbereitung benötigt, um Interferenzen zu minimieren. Wichtigster Aspekt ist dabei, die durch

Matrixeffekte hervorgerufene Ionensuppression zu minimieren [56, 137]. Ebenfalls auszuschließen bzw. abzutrennen sind interferierende Substanzen mit gleichem Masse/Ladungsverhältnis wie die Zielanalyte. Hieraus resultieren falsch positive bzw. zu hohe Werte [249].

3 Experimenteller Teil: Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der neuen Matrix: Zell-desintegriertes Blut (Cell-disintegrated Blood, CDB)

Für die Charakterisierung der Matrix Zell-desintegriertes Blut (CDB) wurden bildgebende Analyseverfahren (1. Lichtmikroskopische Untersuchungen, 2. Untersuchungen mit konfokaler Lasermikroskopie) verwendet und eine Partikeltrennung mit Hilfe von differentieller Zentrifugation durchgeführt. Sie sollten Aufschluss über die Art der Zerstörung der Zellen in einem dynamischen System (in-line) geben. Auf diese Weise konnten weitere Hinweise für eine effiziente Prozessierung von Vollblut durch die Hitze-induzierte Transformation gewonnen werden. Entsprechend den Untersuchungen von Milojković wurden die Versuche bei Temperaturen zwischen 70 und 80°C durchgeführt [7].

3.1.1 Charakterisierung der Matrix durch Lichtmikroskopische Untersuchungen

Bei eintausendfacher Vergrößerung wurden lichtmikroskopische Untersuchungen von Vollblut, CDB und lysiertem Vollblut in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Die mit EDTA antikoagulierten Vollblutproben wurden gesunden Probanden fachgerecht entnommen. Ein Aliquot wurde nativ belassen, ein weiteres wurde unter Standardbedingungen bei 75°C für 16 Sekunden im Wasserbad (off-line) prozessiert (CDB), ein drittes Aliquot wurde 1:20 mit Wasser verdünnt (lysiertes Vollblut). Alle Proben wurden 1:100 mit Trypanblau versetzt und bei 1.000facher Vergrößerung mikroskopiert.

In Abbildung 22 sind unbehandelte Erythrozyten einer Vollblutprobe, subzelluläre Partikel einer CDB-Probe und „Ghosts“ einer lysierten Vollblutprobe nach einer Vitalfärbung mit Trypanblau abgebildet. Angefärbt mit einer Trypanblaulösung erscheinen alle zerstörten Erythrozyten in einem Lichtmikroskop blau. Der blaue Farbstoff bindet an zytosolische Proteine, weswegen auch die subzellulären Partikel blau erscheinen (siehe Abbildung 22B). Die Membranen intakter Zellen kann der Farbstoff nicht passieren. So bleiben native Erythrozyten ungefärbt und leuchten unter dem Mikroskop gelblich (siehe Abbildung 22A). „Ghosts“ sind die Membranhüllen entleerter Erythrozyten und daher im Lichtmikroskop nur schwer aufgrund der sehr geringen Anfärbung zu erkennen (siehe Abbildung 22C).

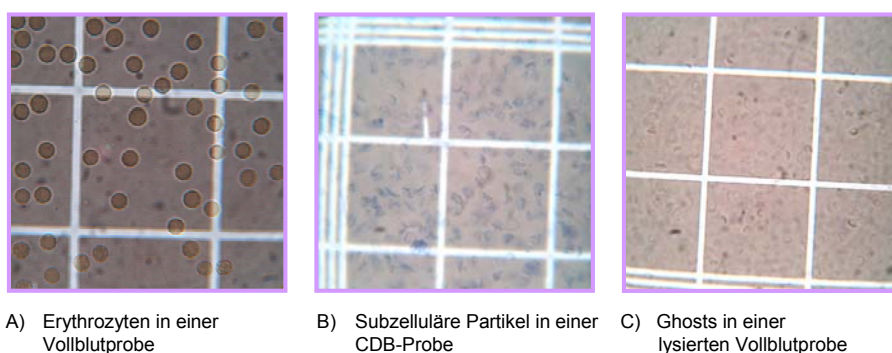


Abbildung 22: Vitalfärbung mit Trypanblau. Erythrozyten, subzelluläre Partikel und „Ghosts“ (1.000fache Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop).

Die klare Lösung von off-line hergestelltem CDB lässt schon gegenüber der opaken Flüssigkeit Vollblut vermuten, dass die durchschnittliche Partikelgröße im CDB wesentlich kleiner ist. In off-line Versuchen konnte von Milojković gezeigt werden, dass die Hitzeschock-Behandlung eine vollständige Desintegration der Erythrozyten und der Leukozyten sowie zu 50% der Thrombozyten hervorruft [7]. Andererseits konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass es innerhalb der Kapillaren des Analysensystems zu einer erheblichen Verdünnung der Vollblutprobe kommen kann. Deswegen ist in einem in-line-System die Erzeugung von „Ghosts“ durch hypotone Lyse zu vermeiden. Für ein vollautomatisches Analysengerät ist die Transformation der Blutzellen in möglichst kleine Partikel von großer Wichtigkeit, um unter anderem die Kapillaren, die SPE-Kartuschen und die analytischen Säule nicht zu verstopfen. Die durchgeführten lichtmikroskopischen Untersuchungen dienten der Visualisierung unterschiedlicher aus Erythrozyten entstandenen Partikelfractionen.

3.1.2 Charakterisierung der Matrix durch Konfokale Laser-Elektronenmikroskopie

Ein Konfokalmikroskop ist eine Variante des Lichtmikroskopes. Das vom Präparat ausgehende Licht, in diesem Falle Fluoreszenzlicht, passiert eine Lochblende, wodurch das Licht außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird, bevor es den Detektor erreicht. Dadurch ist es möglich, das Streulicht zu minimieren. Die effektive Auflösung ist auch ohne Zunahme der Vergrößerung viel höher als in einem herkömmlichen Lichtmikroskop. Bei einem konfokalen Laser-Rastermikroskop wird ein Laser-Brennfleck sehr schnell zeilenweise in einer Objektebene gerastert. Das Licht aus dem Brennfleck wird auf einer kleinen Lochblende abgebildet, hinter der sich ein lichtempfindlicher Empfänger befindet. Aus dem Empfänger-signal wird dann zeilenweise im Computer ein (Schnitt-)Bild zusammengesetzt.

Um die Unterschiede der verschiedenen Matrices deutlich sichtbar zu machen, wurden weitere Untersuchungen mit einem Konfokale Laser-Elektronenmikroskop durchgeführt. Es wurden Vollblutproben, CDB-Proben (CDB) und durch zweimaliges Ausfrieren in flüssigem Stickstoff hergestellte CDB-Proben (CDB(N₂)) mikroskopiert.

Abbildung 23 zeigt semiquantitativ Erythrozyten in einer Vollblutprobe und „Ghosts“ sowohl in einer CDB- als auch in einer CDB(N₂)-Probe. Abbildung 23A zeigt hauptsächlich wohlgeformte bikonkave Erythrozyten in der nativen Vollblutprobe. Vereinzelt Echinozyten sind auf Zentrifugalstress zurückzuführen. In der CDB-Probe (Abbildung 23B) sind zahlreiche scheibenförmige „Ghosts“ zu erkennen. Die „Ghosts“ in der mit Stickstoff behandelten CDB-Probe (Abbildung 23C) scheinen an Membrandicke stärker reduziert worden zu sein. Sie sind im Vergleich zu den „Ghosts“ einer normalen CDB-Probe schlechter zu erkennen und erscheinen noch filigraner.

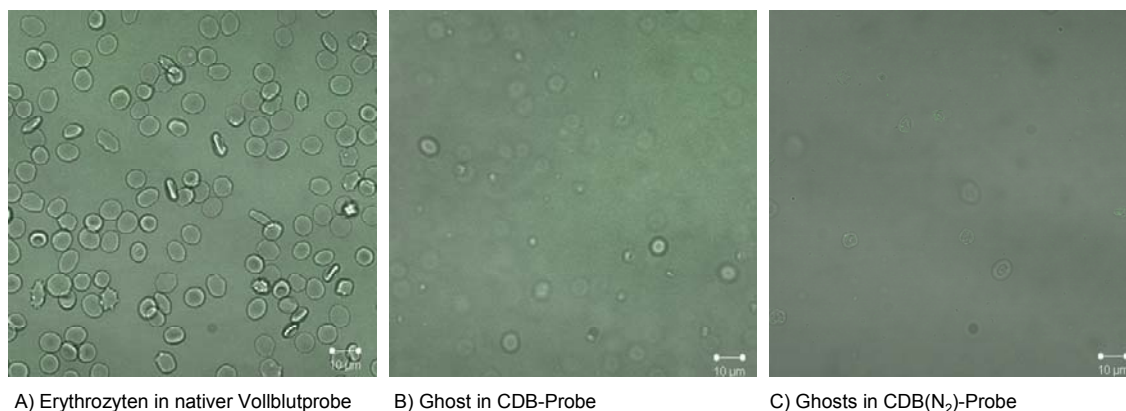


Abbildung 23: Konfokale Laser-Elektronenmikroskopie. Erythrozyten und „Ghosts“ in verschiedenen Matrices. (Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC, Wellenlänge: 488nm, 16-17%, Scan Vergrößerung: 1,0%).

Durch die hohe effektive Auflösung des konfokalen Laser-Elektronenmikroskopes war es an dieser Stelle möglich, die Unterschiede der „Ghosts“ in den verschiedenen Matrices deutlich darzustellen.

Es ist bekannt, dass die Blutzellen durch schnelles Einfrieren und Auftauen ebenfalls zerstört werden. Schnelles Einfrieren wird durch die Behandlung mit flüssigem Stickstoff erreicht. Dabei entstehen ebenfalls subzelluläre Partikel. Die so erhaltene Matrix wurde deswegen in dieser Arbeit als „Goldstandard“ definiert und dient als Vergleichssubstanz.

Leere Zellmembranen können sich nach der „Lyse“ wieder verschließen. Diese als „Ghosts“ bezeichneten leeren Zellhüllen werden vorwiegend bei Erythrozyten beobachtet. Für die Herstellung von Zell-desintegriertem Blut müssen die Prozessparameter demnach so gewählt werden, dass die Zellmembranen möglichst in subzelluläre Partikel zerfallen. Dies gilt insbesondere für die Umsetzung in einem dynamischen System (in-line Prozessierung).

Bei der hypotonen Lyse wurde die Bildung von reversiblen Löchern in Erythrozyten beobachtet, die von der Art des Lysepuffers, der enthaltenen Salzkonzentration und der Temperatur abhängig sind. Mit steigender Temperatur besteht die Tendenz zu wieder verschlossenen „Ghosts“. Ab 50°C wurde ein Zusammenbruch der „Ghost“-Struktur zugunsten von Vesikeln beobachtet [250-251]. Diese Beobachtung steht jedoch im Gegensatz zu in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, die mit einem nach Dodge et al. hergestellten reinen Ghostkonzentrat durchgeführt wurden [18]. Trotz Hitzeschockbehandlung behielten die „Ghosts“ ihre ursprüngliche Größe. Weitere Versuche haben gezeigt, dass sich die Volumina

an „Ghosts“ bei Herstellungstemperaturen zwischen 70 und 90°C nicht merklich unterscheiden. Ebenso hatte auch die Heizdauer keinen Einfluss auf die Menge der gebildeten „Ghosts“.

Die Auswirkung der unterschiedlichen Prozessführung auf die Desintegration der zellulären Blutbestandteile, insbesondere auf die Erythrozyten, wurde ebenfalls mit Hilfe des konfokalen Laser-Elektronenmikroskopes untersucht. Dafür wurden Vollblutproben, CDB-Proben und CDB(N₂)-Proben hergestellt und mikroskopiert. Um die Effekte der Prozessführung auf die Zellmembranen besser sichtbar zu machen, wurden alle Proben mit dem grün fluoreszierenden Membranfarbstoff Annexin angefärbt.

In Abbildung 24 ist ein Erythrozyt vor und nach verschiedenen Behandlungsmethoden dargestellt. Sie zeigt die Größenverhältnisse und Formen eines intakten bikonkaven Erythrozyten in nativem Vollblut (Abbildung 24A) gegenüber einem fast gleich großen scheibenförmigen Ghost in einer mit flüssigem Stickstoff behandelten Probe (Abbildung 24D). Annexin ist ein Membranfarbstoff, der an Phosphatidylserin bindet. In einer nativen Zelle befindet sich Phosphatidylserin an der Innenseite der Membran, weswegen der unbehandelte Erythrozyt (Abbildung 24A) nur leicht grünlich schimmert und nicht leuchtend grün gefärbt ist wie der „nekrotische“ Erythrozyt einer CDB-Probe (Abbildung 24B). Mit Hitzeschock behandelte Erythrozyten haben meistens eine deformierte Gestalt (Abbildung 24C). Ihre Größe ist offensichtlich etwas kleiner. Deutlich zu sehen ist die Stelle, an der die Erythrozytenmembran aufgeplatzt ist. Aufgrund seiner Größe und der perforierten Zellhülle erfüllt dieser Erythrozyt nicht die Kriterien eines „Ghosts“. In CDB befinden sich jedoch auch normal scheibenförmige „Ghosts“, wie Abbildung 23 zeigt.

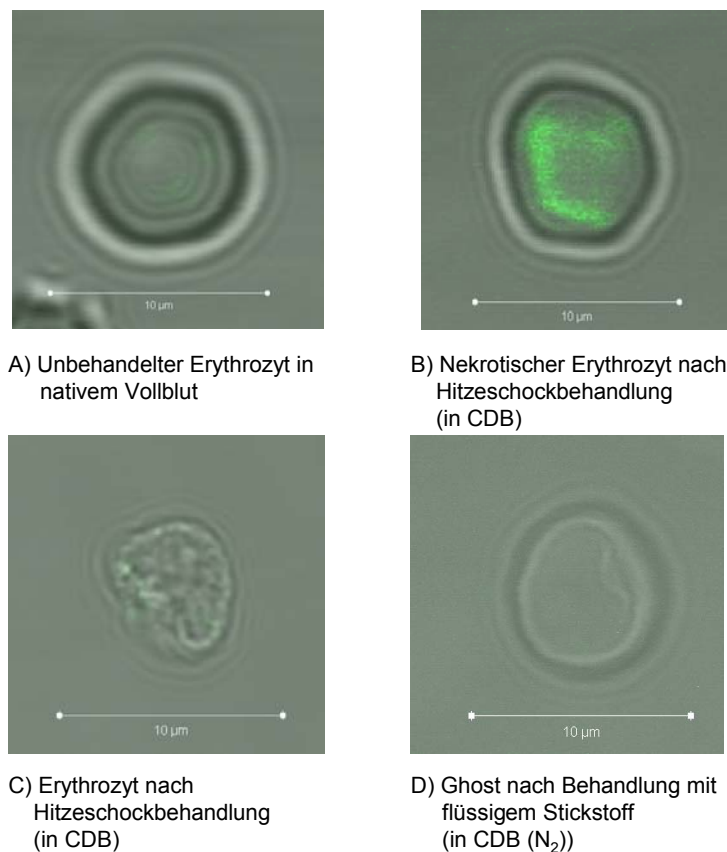


Abbildung 24: Konfokale Lasermikroskopie. Erythrozyten vor und nach verschiedenen Behandlungsmethoden. Abfärbung mit grün fluoreszierendem Membranfarbstoff Annexin (Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC, A: Wellenlänge: 488nm, 16%, Scan Vergrößerung: 9,2%; B: Wellenlänge: 488nm, 16%, Scan Vergrößerung: 2,0%; C: Wellenlänge: 488nm, 16%, Scan Vergrößerung: 7,9%; D: Wellenlänge: 488nm, 17%, Scan Vergrößerung: 7,1%).

Morphologische Veränderungen durch das Erhitzen von menschlichen Erythrozyten wurden erstmals von Schultze (1865) beschrieben [252]. Dabei verändern sich auch Zusammensetzung, Form, Aussehen und Eigenschaften der Erythrozyten [17, 49, 253]. Die in diesen Publikationen beschriebenen Erkenntnisse konnten durch die in dieser Arbeit dargelegten Untersuchungen bestätigt werden.

Im Folgenden wurde der Einfluss des organischen Modifier Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die Herstellung von CDB untersucht. Er wird u.a. für die Zugabe des Internen Standards benötigt und wird in Kapitel 3.3.1 näher erläutert. Dazu wurden antikoagulierte Vollblutproben, CDB-Proben und CDB(N₂)-Proben mit und ohne Zusatz von DMSO verglichen. Um eventuelle Veränderungen der Zellmembranen durch den Zusatz des sehr

lipophilen DMSO sichtbar zu machen, wurden alle Proben mit einem rot fluoreszierenden Plasmamembranfarbstoff (Vybrant DiD) und einem grün fluoreszierenden Intrazellulärfarbstoff (DCF) angefärbt.

Abbildung 25 zeigt die unbehandelte Vollblutprobe mit wohlgeformten bikonkaven Erythrozyten (oben links). Mit Zusatz von DMSO (unten links) liegen auffällig mehr Erythrozyten als Echinozyttyp vor. Darüber hinaus wurden bereits intrazelluläre Bestandteile einiger Zellen abgegeben, wie es an der grünlichen Farbe zu erkennen ist. Während in der CDB-Probe ohne DMSO die Ghostbildung, die stark „eingedellten“ Erythrozyten und die subzellulären Partikel gut zu erkennen sind (mittig oben), bewirkt DMSO in derselben Probe (mittig unten) eine deutliche Partikelverkleinerung. Auch hier wurden bereits intrazelluläre Bestandteile freigesetzt. Bei der Probe, die mit flüssigem Stickstoff behandelt wurde, fällt auf, dass hier kaum „eingedellte“ Erythrozyten zu erkennen sind (oben rechts). Hier liegen vereinzelt „Ghosts“ und subzelluläre Partikel vor. Auch in dieser Probe bewirkt DMSO eine Verkleinerung der Partikel (unten rechts).

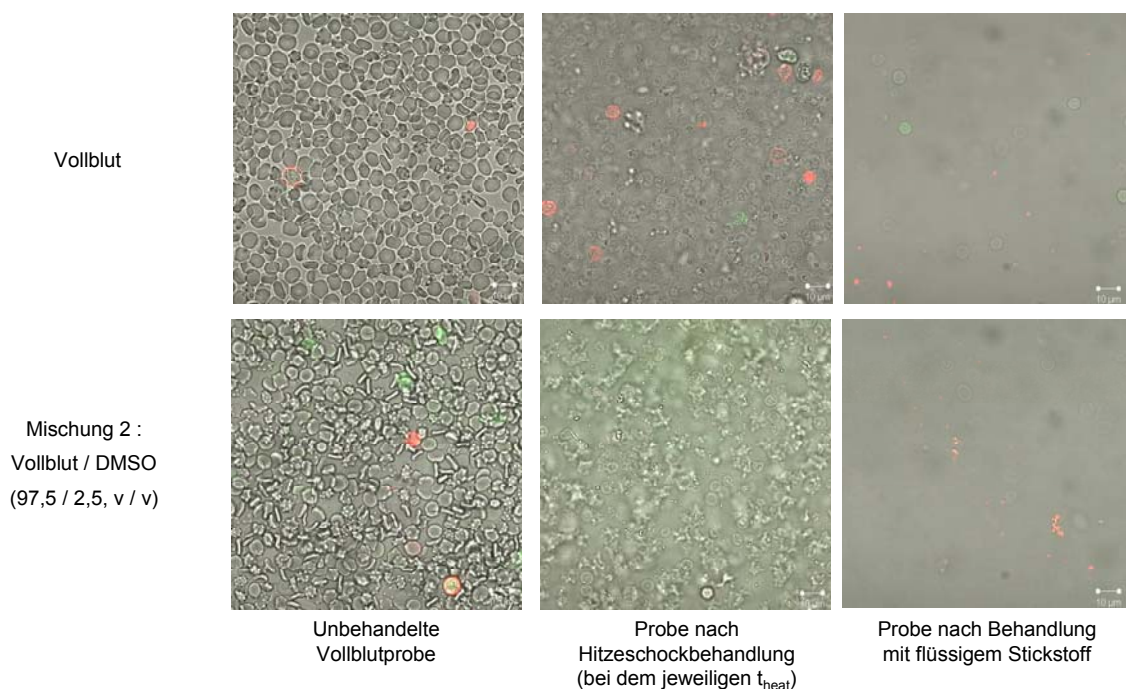


Abbildung 25: Konfokale Lasermikroskopie. Einfluss von DMSO auf die Zellmembranen bei unterschiedlichen Herstellungsverfahren von CDB. Anfärbung mit dem rot fluoreszierenden Plasmamembranfarbstoff Vybrant DiD und dem grün fluoreszierenden Intrazellulärfarbstoff DCF. (Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC, Wellenlänge: 488nm 42-43%, 594nm 34-39%, Scan Vergrößerung: 1,0).

DMSO kommt einem zusätzlichen Stressfaktor für die Zellen gleich. Schon in der unbehandelten Probe hat der Zusatz von DMSO zur Folge, dass ein Großteil der Erythrozyten zum Echinozyttypen wird. DMSO bewirkt auch eine Partikelverkleinerung bei der Prozessierung.

3.1.3 Charakterisierung der CDB Matrix durch differentielle Zentrifugation

Um die CDB Matrix näher zu charakterisieren, wurde eine differentielle Zentrifugation durchgeführt, die in Abbildung 26 dargestellt ist.

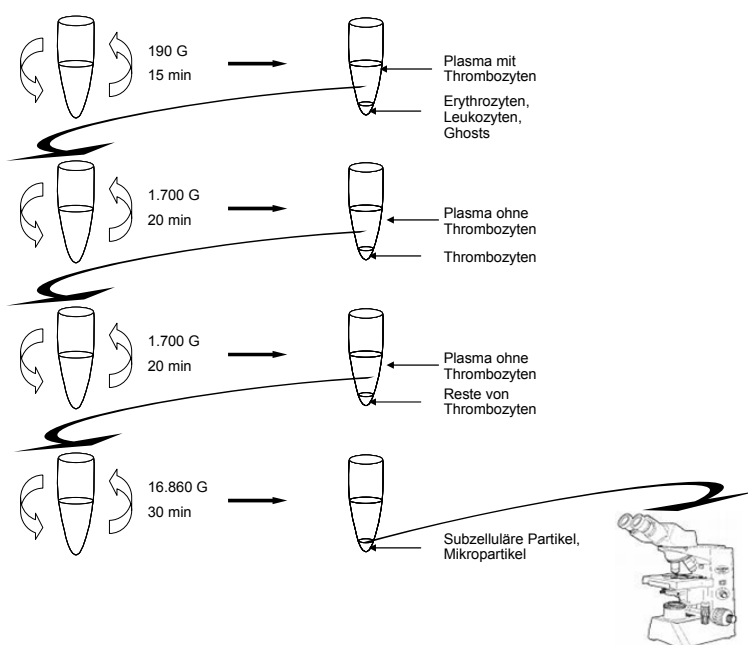


Abbildung 26: Differentielle Zentrifugation. Schematische der Isolierung von subzellulären Partikeln und Mikropartikeln aus verschiedenen Matrices.

Die Separation bei einer differentiellen Zentrifugation beruht dabei auf Größe und Dichte der Zellen und Zellbestandteile. Größere und dichtere Zellen, wie beispielsweise intakte Erythrozyten und Leukozyten, setzen sich bei geringer Zentrifugalkraft ab, während sich Thrombozyten und Zellbruchstücke erst bei höherer Zentrifugalkraft abtrennen lassen. Zur Sedimentation bzw. Isolierung von über 90% der Mikropartikel aus Plasma muss eine Probe 30 Minuten bei 20.000g zentrifugiert werden [32, 254].

Für die Untersuchung des Einflusses des organischen Modifiers (z.B. DMSO) wurden die subzellulären Partikelfractionen von verschiedenen Mischungen (siehe Kapitel 3.3.1) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Die Anfärbung der Zellen erfolgte mit dem rot fluoreszierenden Plasmamembranfarbstoff Annexin. Die subzellulären Partikel und Mikropartikel der unbehandelten Vollblutprobe (Abbildung 27A) und seiner Mischungen (Abbildung 27B und Abbildung 27C) zeigen eine starke Neigung zur Agglomeration. Auch die Mikropartikelfraktion der prozessierten Vollblutprobe (Abbildung 27D) zeigt noch einige Agglomerate, während die prozessierten Mischungen mit organischem Modifier (Abbildung 27E und Abbildung 27F) fast keine Agglomerationen zeigen. Dabei ist kein signifikanter Unterschied durch die Art des Modifiers sichtbar.

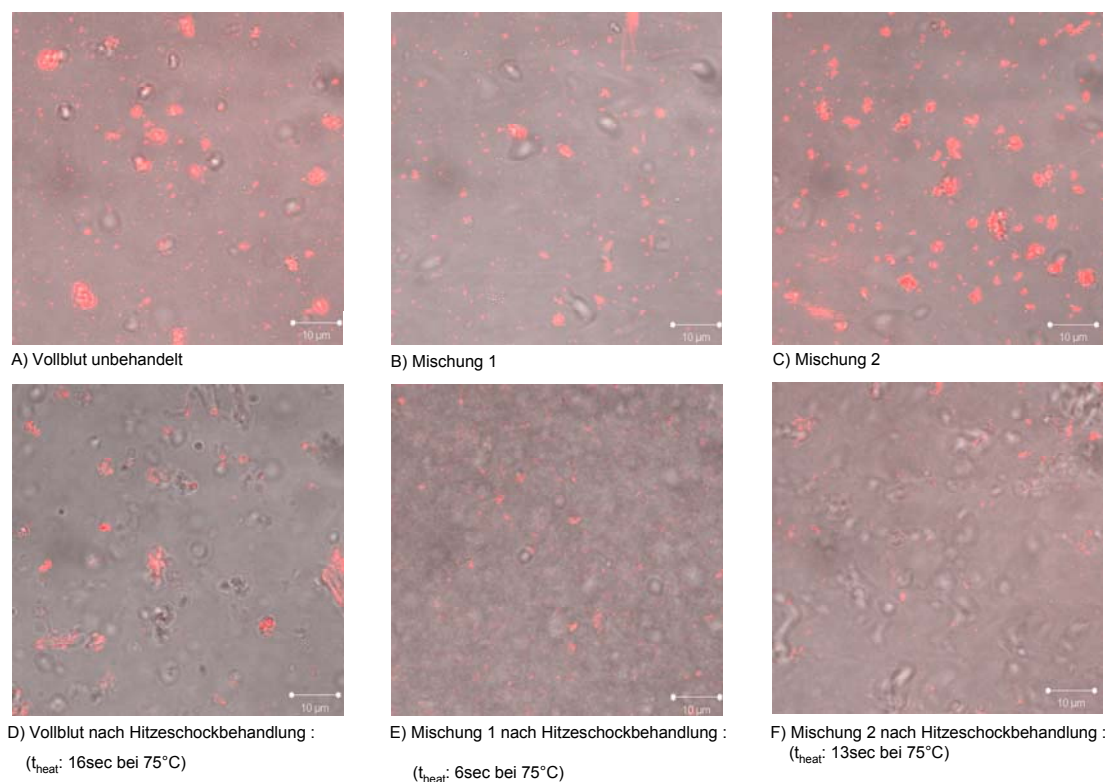


Abbildung 27: Konfokale Lasermikroskopie Hitzeschock-behandelter Proben. Einfluss des organischen Modifiers auf die Bildung subzellulärer Partikel. Anfärbung mit dem rot fluoreszierenden Plasmamembranfarbstoff Annexin. (Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC, Wellenlänge: 594nm, 47,6%, Scan Vergrößerung: 2,0).

Der Einfluss der Prozessführung auf die Entstehung von subzellulären Partikeln und möglicherweise Mikropartikeln wurde in Vollblutproben, CDB-Proben und CDB(N₂)-Proben untersucht. Alle Proben wurden mit dem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff Vybrant DiD

und dem grün fluoreszierenden Intrazellulärfarbstoff DCF angefärbt. Folgende Trends sind aus Abbildung 28 ersichtlich: die Menge an subzellulären Partikeln und Mikropartikeln nimmt von der unbehandelten Probe über die CDB-Probe bis hin zur in flüssigem Stickstoff behandelten Probe zu (von links nach rechts). DMSO bewirkt eine gesteigerte Bildung an Mikropartikeln (untere Reihe). Alle entstandenen subzellulären Partikel und Mikropartikel entstammen den ursprünglichen Membranen (durch Membranfarbstoff Vybrant DiD rot gefärbte Partikel).

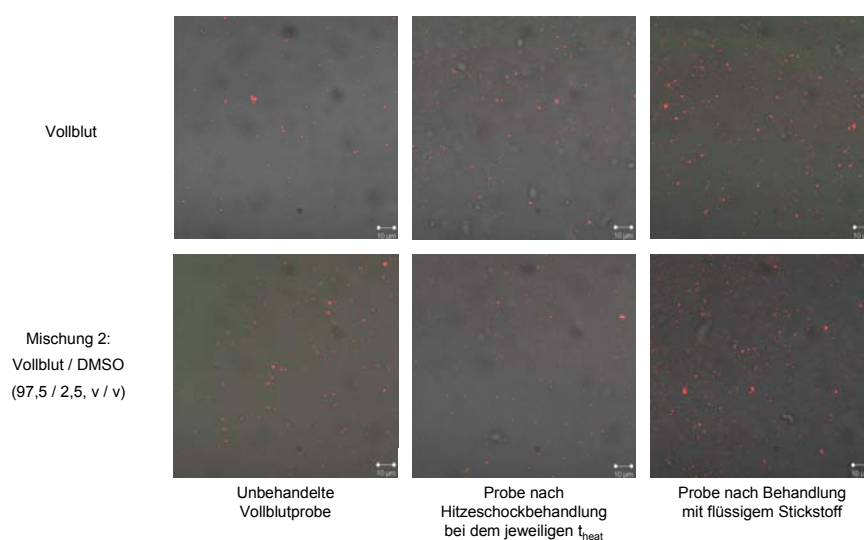


Abbildung 28: Konfokale Lasermikroskopie. Einfluss der Prozessführung auf die Entstehung von subzellulären Partikeln und Mikropartikeln aus Vollblut. Anfärbung mit dem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff Vybrant DiD und dem grün fluoreszierenden Intrazellulärfarbstoff DCF. (Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC Wellenlänge: 488nm 42-43%, 594nm 34-39%, Scan Vergrößerung: 1,0).

Über 100 Jahre nach den Aufzeichnungen von Schultze (1865) haben Untersuchungen von Coakley et al. gezeigt, dass es bei der Behandlung von Erythrozyten mit Hitze zu vielfältigen morphologischen Veränderungen kommen kann, die von der Temperatur und von der Aufheizgeschwindigkeit abhängig sind. Neben der Hämolyse werden auch Fragmentation bzw. eine Abschnürung subzellulärer Partikel von Zellen und eine Mikrovesikulierung bzw. ein Zusammenbruch der Ghostmembranen in kleine subzelluläre Partikel beobachtet [53, 255]. Diese Beobachtungen konnten durch die vorgenommenen Untersuchungen bestätigt werden. Eine gesteigerte Mikrovesikulierung wurde bei den mit flüssigem Stickstoff behandelten Proben beobachtet. Ebenfalls konnte eine vermehrte Mikrovesikulierung nach Zusatz von DMSO beobachtet werden.

Abbildung 29 stellt zusammenfassend die morphologischen Änderungen dar, die in einer Vollblutprobe durch die beschriebene Hitzeschockbehandlung und Transformation zu CDB auftreten. Nach der in-line Prozessierung von Vollblut sind keine Erythrozyten mehr nachweisbar. Erkennbar sind subzelluläre Partikel, Membranbruchstücke, Mikropartikel und „Ghosts“. Der Zellinhalt ist gleichmäßig in der Probe verteilt, was anhand des grün fluoreszierenden Intrazellulärfarbstoffes nachweisbar ist. Die Zellmembran wurde zerstört. Dies ist an den rot fluoreszierenden subzellulären Bruchstücken erkennbar. Ebenfalls noch in der Probe nachweisbar sind einige nicht zerstörte Thrombozyten und „Ghosts“.

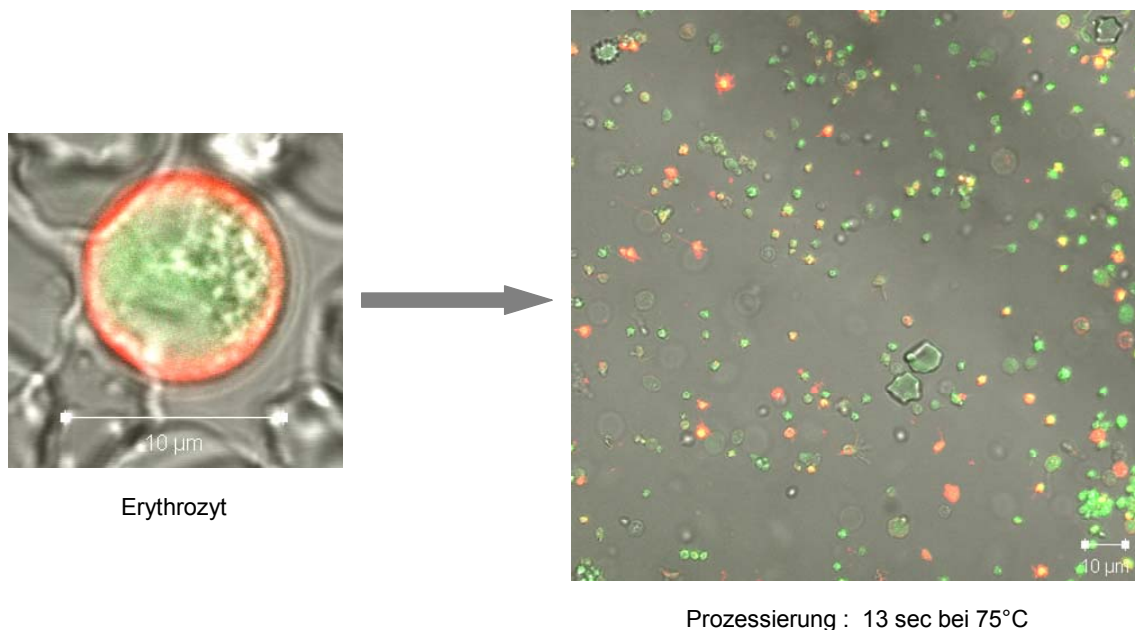


Abbildung 29: Konfokale Lasermikroskopie. Morphologische Änderung der Blutzellen nach Hitzeschockbehandlung. Vollblut/DMSO (97,5/2,5, v/v)-Probe angefärbt mit dem rot fluoreszierenden Membranfarbstoff Vybrant DiD und dem grün fluoreszierenden Intrazellulärfarbstoff DCF. (Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC, Wellenlänge (Erythrozyt): 488nm 40% und 594nm 35% Scan Vergrößerung: 4,5; Wellenlänge 488nm 43% und 594nm 34%, Scan Vergrößerung: 1,0).

3.2 Aufbau eines vollautomatisierten Analysensystems

Im folgenden Kapitel wird der instrumentelle Aufbau einer Analysenplattform für die direkte und vollautomatisierte SPE-LC-MS/MS Bestimmung von Immunsuppressiva in Vollblut beschrieben.

3.2.1 Instrumenteller Grundaufbau

Zur Umsetzung der Aufgabenstellung wurde ein kommerziell erhältliches Analysengerät umgebaut. Die Grundlage bildete das Symbiosis™ Pharma System der Firma Spark Holland. Dabei handelt es sich um ein automatisiertes on-line SPE-System. Der instrumentelle Aufbau ist in Abbildung 30 zu sehen.

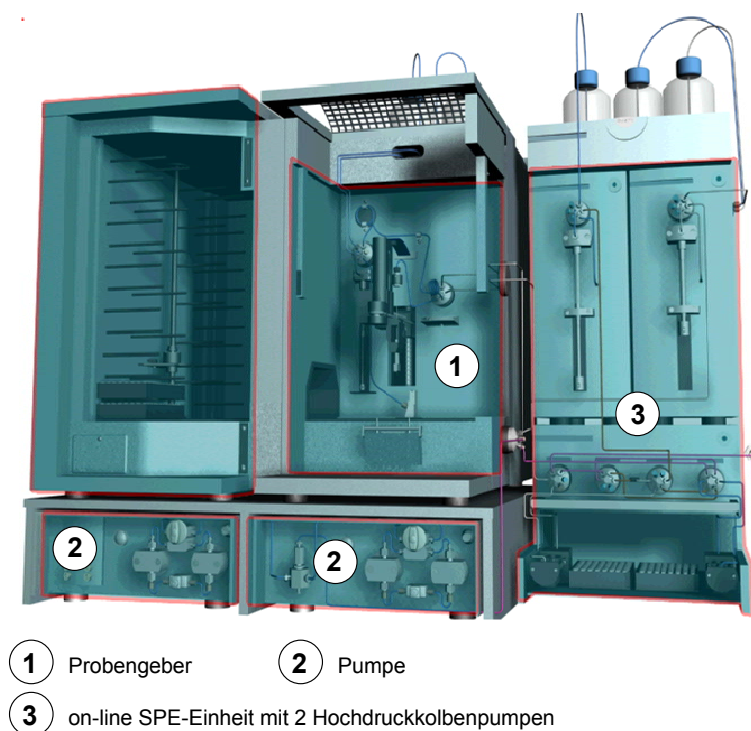


Abbildung 30: Instrumenteller Aufbau des Symbiosis™ Pharma Systems [256].

Das Gerät besteht aus folgenden Modulen: (1.) einem Probengeber „Reliance“, (2.) zwei binären Pumpen und (3.) einer on-line SPE-Einheit mit zwei Hochdruckkolbenpumpen (High

Pressure Dispenser, HPD) und einem kombinierten System aus 6-Wege Schaltventilen. Die Steuerung erfolgt durch die Software SparkLink oder MassLynx.

Im Unterschied zu den gängigen on-line SPE-Systemen, die SPE-Säulen verwenden, arbeitet das Symbiosis™ Pharma System mit SPE-Einmalkartuschen. Das Symbiosis™ Pharma System ist für folgende Arbeitsweise ausgelegt: Zu Beginn eines Analysenzyklus wird eine SPE-Kartusche zunächst in die erste Halterung eingesetzt. Nach dem Konditionierungs-, Beladungs- und Waschschrift wird diese Kartusche in die zweite Halterung umgesetzt und eluiert.

Vorteil dieses on-line SPE-Systems gegenüber einem konventionellen Säulenschaltssystem ist die Verwendung von Einmalkartuschen [72, 256-257]. Bei SPE-Säulen kann eine mehrfache Verwendung mit der Zeit zu Selektivitäts- und Kapazitätsverlust führen. Hinzu kommt die Gefahr von Kreuz-Kontaminationen und „Carry-over“, wenn die Proben nicht vollständig eluiert werden. On-line SPE-Techniken haben allgemein den Vorteil, dass die Methodentwicklung schneller wird und die Probenvorbereitungszeit stark verkürzt wird. So kann auch der Probendurchsatz stark erhöht werden. Konditionieren, waschen und eluieren funktionieren automatisch.

3.2.2 Instrumenteller Aufbau und Funktionsweise des Analysensystem für die automatisierte Bestimmung von Pharmaka in Vollblut

Ziel der Arbeit war der Aufbau eines Analysensystems, das schematisch in Abbildung 31 dargestellt ist. Es kann in folgende Einheiten aufgegliedert werden: Probengeber, Prozessierung, Aufreinigung, Trennung, Detektion und Datenverarbeitung.

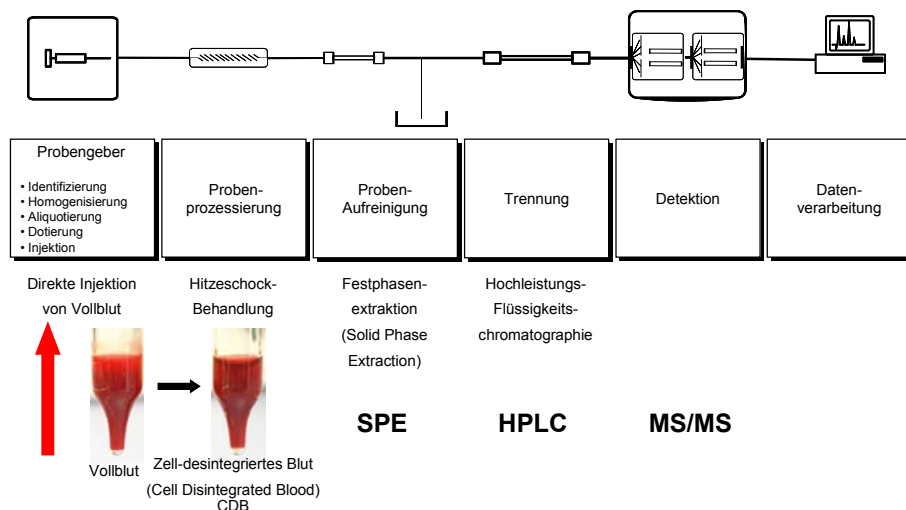


Abbildung 31: Schematische Darstellung eines Analysensystems für die direkte und automatische Bestimmung von Pharmaka in Vollblut.

3.2.3 Modifikation des Symbiosis Pharma Systems

Probengeber (Autosampler)

Der Probengeber (Reliance) besteht aus einer 1mL Spritze, einem 6-Wege-Injektionsventil mit integrierter Probenschleife (200µL) und einer Seruminjektionsnadel (45µL). Die Serumnadel wird von einer Punktiernadel umschlossen.

Die Steuerungssoftware ermöglicht folgende Injektionsmodi:

- **Komplettbefüllung der Probenschleife:**
Vorteil ist die geringste Standardabweichung unter allen Injektionsmodi. Das Injektionsvolumen kann jedoch nur durch den Austausch der Injektionsschleife erfolgen und ist zudem von den vordefinierten Volumina abhängig.

- Teilbefüllung der Probenschleife:

Der gängigste Injektionsmodus ist die Teilbefüllung der Probenschleife. Vorteil ist das variable Injektionsvolumen. Jedoch muss erst ein definiertes Probenvolumen in die Probenschleife gezogen werden, um das Nadelvolumen mit Probe zu befüllen. Erst dann wird das gewünschte Injektionsvolumen an Probe aufgezogen. Bei diesem Verfahren wird viel Probe ungenutzt in den Abfall gespült.

- Minimalbefüllung im μL -Bereich:

Für sehr geringe Injektionsvolumina, wie sie in der klinisch-chemischen Analytik angestrebt werden, steht eine weitere Methode zur Verfügung. Die Probe wird mit Hilfe einer mobilen Phase in die Probenschleife transportiert. So können auch Volumina im einstelligen μL -Bereich injiziert werden. Die Standardabweichung ist mit 1% immer noch gut [258].

Für eine vollautomatisierte Analyse von Pharmaka aus Vollblut ist die Anforderung an die Leistungsmerkmale eines Probengebers erhöht. Die Implementation von weiteren Funktionen ist daher unumgänglich. Größter Nachteil dieses Probengebers ist die fehlende Mischfunktion. Daher ist derzeit ein Vollblutanalyse nur nach manuellem Mischvorgang möglich. Des Weiteren ist ein intensiver Waschvorgang für die Injektionsnadel notwendig. So wird insbesondere ein „Carry-over“ vermieden. Die automatische Identifizierung der Proben wäre darüber hinaus mit Hilfe eines Barcode-Lesegerätes möglich.

Probenprozessierung

Damit die Prozessierung einer Vollblutprobe in-line möglich ist, wurde eine beheizbare Edelstahlkapillare (Heated Capillary, HC) neu in das System integriert. Um eine Verdünnung der Probe zu vermeiden, ist sie direkt hinter dem 6-Wege Ventil der Injektionseinheit eingebaut. Sie ist 30cm lang, hat einen Innendurchmesser von 0,5mm und kommt somit auf ein Gesamtvolumen von 59 μL . Die Kapillare ist ganz dicht auf einen Metallzylinder von 3mm Durchmesser gewickelt. Ein Überzug aus Kunststoff bildet die Isolierung. Die Temperatur kann über die Steuerungssoftware zwischen 3°C über Raumtemperatur und 100°C eingestellt werden. Die Wärmeübertragung erfolgt über Induktion.

Fraktionierungseinheit

Die Fraktionierungseinheit im Symbiosis™ Pharma System erlaubt die Kopplung der automatisierten SPE mit der LC [259]. Diese Einheit wurde im Rahmen dieser Arbeit für die nachstehenden Untersuchungen modifiziert. Dazu wurde ein zweites 6-Wege Schaltventil mit integriertem T-Stück eingebaut. Der Einbau erfolgte um 180° verdreht, sodass aus dem Einkartuschen-on-line SPE-System ein Mehrkartuschen-on-line SPE-System entsteht. Der modifizierte Aufbau des Symbiosis™ Pharma Systems ist in Abbildung 32 zu sehen:

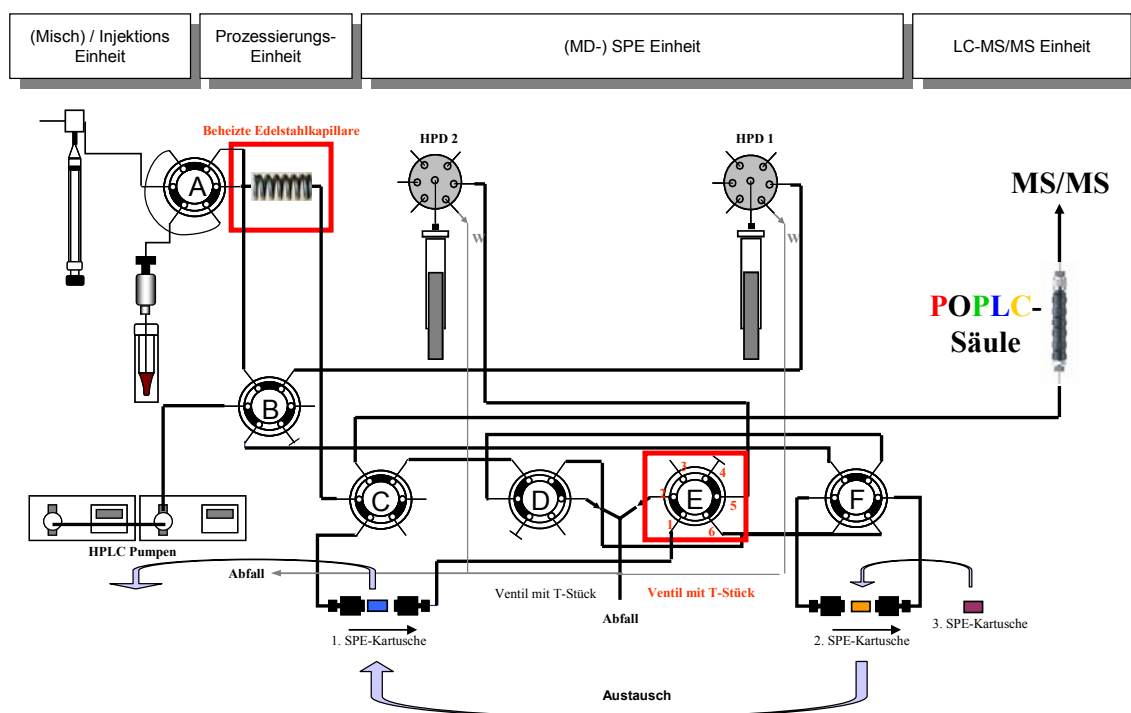


Abbildung 32: Schematische Darstellung des modifizierten Symbiosis™ Pharma Systems; neu in das System integriert wurden die beheizte Edelstahlkapillare und ein zweites Ventil mit integriertem T-Stück (siehe rote Rahmen) [7]. Die beheizte Edelstahlkapillare ist direkt hinter dem Injektionsventil zur in-line Hitzeschockbehandlung eingebaut worden. Das zweite Ventil mit integriertem T-Stück wurde zur multidimensionalen Probenaufbereitung mit in-line Verdünnung eingebaut. HC (Heated Capillary): beheizte Edelstahlkapillare; HPD (High Pressure Dispenser): Kolbenpumpe; MS/MS: Tandem-Massenspektrometer.

Die MD-SPE Plattform ist das Kernstück des instrumentellen Aufbaus. Für die Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut wurden folgende drei SPE-Kartuschen verwendet (siehe Kapitel 2.2.1.4):

1. RAM Kartusche (LiChrospher® ADS RP4) oder C8 Kartusche (HySphere C8 EC-SE),
2. PLR Kartusche (ProntoSil PLR)
3. „Mixed-mode“ Kartusche (Oasis® MCX).

Die Plattform kombiniert damit vier zueinander orthogonale chromatographische Trennprinzipien. Auf der RAM SPE-Kartusche werden die Größenausschlusschromatographie (SEC) und die Umkehrphasenchromatographie (RPC) simultan ausgenutzt. Auf der PLR Kartusche wird mit Hilfe der molekularen Formerkennung gearbeitet. Die „mixed-mode“ Kartusche nutzt die Ionenaustauschchromatographie (IEC) und die hydrophile-lipophile Interaktionschromatographie (HLBC) (siehe Tabelle 4). Insgesamt unterliegt eine Probe damit fünf chromatographischen Trennmechanismen.

Arbeitsweise der MD-SPE Plattform

Die Aufbereitung einer unbehandelten Vollblutprobe über die MD-SPE Plattform kann in 6 Schritte unterteilt werden:

1. Fraktionierung auf der 1. SPE-Kartusche (Abtrennung hochmolekularer Matrixkomponenten),
2. Transfer der niedermolekularen Fraktion auf die 2. SPE-Kartusche,
3. Fraktionierung auf der 2. SPE-Kartusche (Abtrennung von (Phospho-)Lipiden),
4. Transfer des „front-cut“-Bereiches auf die 3. SPE-Kartusche,
5. Fraktionierung auf der 3. SPE-Kartusche (Abtrennung von weiteren hydrophilen und anionischen Substanzen),
6. Transfer der Analyte auf die analytische Trennsäule.

Die Aufbereitung einer prozessierten Vollblutprobe mit Hilfe mehrerer SPE-Kartuschen wird wie folgt durchgeführt: in beide Klemmen werden verschiedene SPE-Kartuschen (1. und 2. Kartusche) gleichzeitig eingesetzt und konditioniert. Die linke Kartusche wird mit der Probe beladen. In dieser werden die Zielanalyte extrahiert, während nicht retenierte Probenmatrix in den Abfall gespült wird. Idealerweise werden hier schon alle potenziell interferierenden Matrixbestandteile eliminiert. Anschließend wird die erste Kartusche mit verschiedenen mobilen Phasen gewaschen werden. Durch den Einbau des neu eingebauten Ventils mit

integriertem T-Stück (Ventil E in Abbildung 32) und mit Hilfe der ersten HPD, kann der Analyt mit einer mobilen Phase stärkerer Elutionskraft von der ersten Kartusche auf die zweite transferiert werden. Häufig kann der Analyt aus der mobilen Phase mit der stärkeren Elutionskraft jedoch nicht auf der zweiten Kartusche extrahiert werden. Deswegen wird die mobile Phase mit Hilfe der zweiten HPD über dasselbe Ventil mit integriertem T-Stück (Ventil E in Abbildung 32) mit einer weiteren mobilen Phase verdünnt. Durch diesen Mechanismus steht dem System ein Transfer mit einer sogenannten „in-line Verdünnung“ von der ersten Kartusche auf die Zweite zur Verfügung. Auf der zweiten Kartusche wird die Probe erneut fraktioniert und die Probenmatrix weiter abgereichert. Auch diese Kartusche kann gegebenenfalls noch gewaschen werden. Zur gleichen Zeit kann die erste Kartusche wieder zurück in die Vorratsbox gesetzt werden. Im Anschluss wird die zweite Kartusche, die jetzt die extrahierten Analyten enthält, von der rechten in die linke Klemme umgesetzt. Eine dritte Kartusche kann nun in die frei gewordene rechte Klemme gesetzt und ggf. konditioniert werden.

Wie zuvor beschrieben wird die Analytfraktion nun mit einer mobilen Phase hoher Elutionskraft von der zweiten auf die dritte Kartusche gespült. Dort wird diese Fraktion mit einem dritten chromatographischen Trennmechanismus fraktioniert und weitere Interferenzen abgereichert. Theoretisch könnte dieser Mechanismus beliebig oft wiederholt werden.

Separationseinheit

Nach der vollständigen Fraktionierung der Probe folgt der Trennungsschritt der extrahierten Analyte. Diese Einheit gehört nicht zum Symbiosis™ Pharma System. Die dafür benötigte analytische Säule wird frei gewählt.

Für den Separationsschritt wird das 6-Wege-Ventil der rechten Klemme (Ventil F in Abbildung 32) so geschaltet, dass der Pumpenfluss nun über die rechte Kartusche auf die in Reihe geschaltete analytische Säule geleitet wird. Auf diese Weise können die extrahierten Analyte durch ein ausreichend starkes Elutionsmittel von dem Material der SPE-Kartusche desorbiert und auf die analytische Säule transferiert werden. Häufig bindet das SPE-Material die Analyte jedoch so stark, dass das gewählte Elutionsmittel die Analyte zwar vom SPE-Material desorbieren kann, es jedoch keine Trennung auf der analytischen Säule mehr zulässt. Für diesen Fall gibt es beim Symbiosis™ Pharma System die Möglichkeit, über das schon im

System vorhandene Ventil mit integriertem T-Stück (Ventil D in Abbildung 32) die Probe „in-line“ zu verdünnen. Diese Variante kann auch zur Aufkonzentrierung der Analyten am Kopf der analytischen Säule genutzt werden („Peak Kompression“).

Das originale Symbiosis™ Pharma System arbeitet in einem Parallelmodus [74]. Während der Analyse einer ersten Probe erfolgt gleichzeitig die Extraktion einer zweiten Probe [260]. Auch in der multidimensionalen Version ist ein gewisser Parallelmodus möglich. Nachdem die Zielanalyte von der letzten Kartusche auf die analytische Säule transferiert worden sind startet der analytische Trennvorgang der ersten Probe. Währenddessen kann Ventil E wieder zurückgeschaltet und in der linken Klemme bereits eine neue erste Kartusche konditioniert werden. Dieses Verfahren erspart vor allem dann Zeit, wenn die erste Kartusche eine längere Konditionierung benötigt als die Zweite. Weiterhin kann das Ventil der rechten Klemme (Ventil F in Abbildung 32) wieder in die Ursprungsposition zurückgeschaltet, nachdem die Analyte von der zweiten Kartusche eluiert worden sind, werden. So kann auch die Konditionierung einer neuen zweiten Kartusche für den nächsten Lauf bereits konditioniert werden, während die analytische Trennung des ersten Laufes über die Pumpen noch zu Ende geführt werden kann.

Detektionseinheit

Die Detektionseinheit gehört ebenfalls nicht zum Symbiosis™ Pharma System. Sie kann aber leicht an das System angeschlossen werden, indem sie nach die analytische Säule geschaltet wird. So ist der Detektionsmodus stets variabel.

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Pharmaka und/oder endogener Verbindungen können verschiedene Detektoren genutzt werden. Klassische Detektoren basieren auf UV/VIS-, Fluoreszenz- und elektrochemischer Technologie. Nachteilig an ihnen ist, dass sie nicht substanzspezifisch arbeiten. Dies hat zur Folge, dass die Proben für eine saubere Detektion sehr stark aufgereinigt und „Basislinien“ getrennt werden sollten. In dieser Arbeit wird fast ausschließlich mit einem Quattro Micro™-Tandem-Massenspektrometer der Firma Waters gearbeitet. Es wird durch die Software „Symbiosis for MassLynx“ angesteuert. Die Vorteile eines MS/MS-Detektors sind die hohe Empfindlichkeit und die substanzspezifische Detektion. Bei vielen MS/MS-Methoden wird daher auf eine vollständige chromatographische Trennung verzichtet. Eine gute chromatographische Trennung kann aber

unter Umständen wieder notwendig werden, wenn beispielsweise Analyte, ihre Metabolite oder Interne Standards die gleiche Masse besitzen ($\pm 3m/z$). Diese Substanzen sind isobar und im Massenspektrometer nicht zu unterscheiden.

Bestehende Methoden zur Bestimmung von Immunsuppressiva aus Vollblut beinhalten eine off-line Proteinpräzipitation für die Probenaufbereitung [233, 236-237, 242, 261-263]. Polson et al. konnten zeigen, dass eine Proteinpräzipitation nicht ausreichend ist, um alle Matrixkomponenten zu entfernen, die zur einer Ionensuppression führen [57]. Des Weiteren konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass eine „mixed-mode“ SPE die Ionensuppression stärker reduziert als eine Proteinpräzipitation [264-267]. Deswegen erfolgte die Probenaufbereitung in der vorliegenden Arbeit über mehrere SPE-Materialien bzw. Kartuschen, so u.a. auch über eine „mixed-mode“ Kartusche. HPLC gekoppelt an MS wird als hoch selektive Methode zur Analyse von Immunsuppressiva angewendet. Eine on-line Kopplung hat neben der verkürzten Probenaufbereitungszeit und dem damit verbundenen höheren Probenumsatz noch weitere Vorteile. Das Kontaminationsrisiko ist stark vermindert und die Präzision und Richtigkeit sind erhöht. Es reichen sehr kleine Probenvolumina, um eine ausreichende Sensitivität zu erreichen. Größter Nachteil einer HPLC-MS/MS Kopplung sind Matrixeffekte, die zu nicht validen Resultaten führen [56, 74, 137, 268]. Daher sollen diese Matrixeffekte durch die vorangestellte multidimensionale SPE weitestgehend eliminiert werden. Um einen hohen Probenumsatz zu erzielen, wurde oftmals sogar auf den Separationsschritt verzichtet.

3.3 Entwicklung einer MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Immunsuppressiva aus Vollblut

Hauptziel der Arbeit war es, eine vollautomatisierte Methode zu erarbeiten, mit der eine Suppression oder eine Verstärkung der Ionisation durch interferierende Substanzen der Matrix ausgeschlossen werden kann. Milojković zeigte, dass Immunsuppressiva direkt aus Vollblut

bestimmbar sind [7]. Die Methode unterlag starker Ionensuppression. Derzeit sieht die amerikanische Zulassungsbehörde (Federal Drug Administration of the United States, FDA) für bioanalytische Methoden vor, dass Matrixeffekte bewertet und ausgewiesen werden [132].

Eine Methodenentwicklung in der on-line SPE-LC-MS/MS beinhaltet normalerweise drei separate Arbeitsschritte, die gekoppelt werden müssen: Probenaufbereitung (Aufreinigungsvorgang), Chromatographie (Trennungsvorgang) und Massenspektrometrie (Detektionsvorgang). Für ein vollautomatisiertes System ist eine Integration des Probenmisch-/Injektionsvorganges und des Prozessierungsvorganges notwendig (siehe Abbildung 31). Im folgenden Kapitel wird für jede dieser fünf Teileinheiten separat eine methodische Vorgehensweise entwickelt bzw. optimiert.

3.3.1 Entwicklung und Optimierung der Vorgänge in der Probenmisch- und Injektionseinheit

Der erste Teilschritt einer automatischen Vollblutanalyse von Immunsuppressiva beinhaltet folgende Vorgänge:

1. Mischvorgang der sedimentierten Vollblutprobe,
2. Zugabe des Internen Standards,
3. Injektionsvorgang.

Für diese drei Vorgänge erfolgte die Programmierung des Probengeber des Symbiosis® Pharma Systems. Dafür wurde in der Software eine entsprechende Parametereinstellung aus den voreingestellten Aktionsmöglichkeiten (x-, y-, z-Bewegung des Gebers, Lösemittelwahl, Injektionsvolumen, Nadelhöhen, Aufzieh- und Injektionsgeschwindigkeiten, Ventilstellungen, Kommunikationssignale zu anderen Geräten, zeitlicher Ablauf usw.) vorgenommen.

Probenmischvorgang

Das originale Symbiosis® Pharma System besitzt keine Mischvorrichtung. Daher wurde ein Mischverfahren entwickelt, das ohne zusätzliche apparative Veränderungen an dem

verwendeten System (Symbiosis™ Pharma) funktioniert. Dieses Verfahren beruht auf einer gezielten Erzeugung von Luftblasen in einem speziellen Probengefäß. Im mittleren Teil der Abbildung 33 ist das verwendete Probengefäß während eines Mischvorganges abgebildet. Im linken Teil der Abbildung 33 ist eine sedimentierte Vollblutprobe vor einem Mischvorgang zu sehen. Der rechte Teil zeigt eine durchmischte Probe kurz nach dem Mischvorgang. In Vorversuchen wurde nachgewiesen, dass es mit Hilfe der Erzeugung von möglichst großen Luftblasen zu einer starken Aufwirbelung einer sedimentierten Vollblutprobe kommt. Dadurch entsteht eine vollständige Durchmischung. Das Nadeldesign und das Probengefäß wurden so verändert, dass die Bildung von großen Luftblasen erfolgt. Das Probengefäß muß dabei im Bereich der Entstehung der Luftblase schmal sein. Deshalb wurde ein konisch geformter Einsatz in das Probengefäß eingesetzt. Des Weiteren erfolgte die Optimierung der Parameter: Nadeldesign, Platzierung der Nadel im Probengefäß, die Anzahl der Luftblasen, das Volumen der benötigten Luft und die Stärke bzw. die Schnelligkeit der Entstehung der Luftblase.

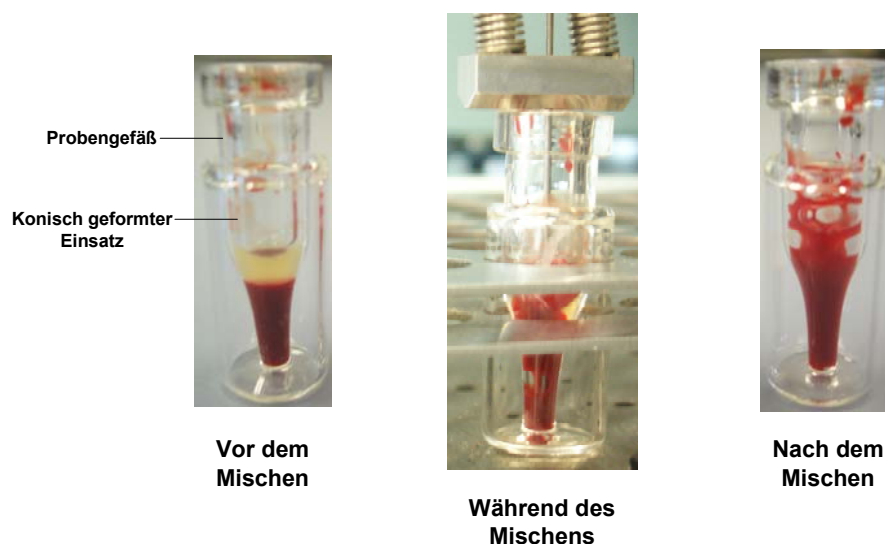


Abbildung 33: Ausschnitte aus einem Mischzyklus. links: sedimentierte Vollblutprobe vor dem Mischen; Mitte: Durchmischen der Probe bei der ersten Luftblase; rechts: Probe nach dem Mischen durch 5 Luftblasen.

Abbildung 34 zeigt die konventionelle und die modifizierte Geometrie der verwendeten Injektionsnadel.

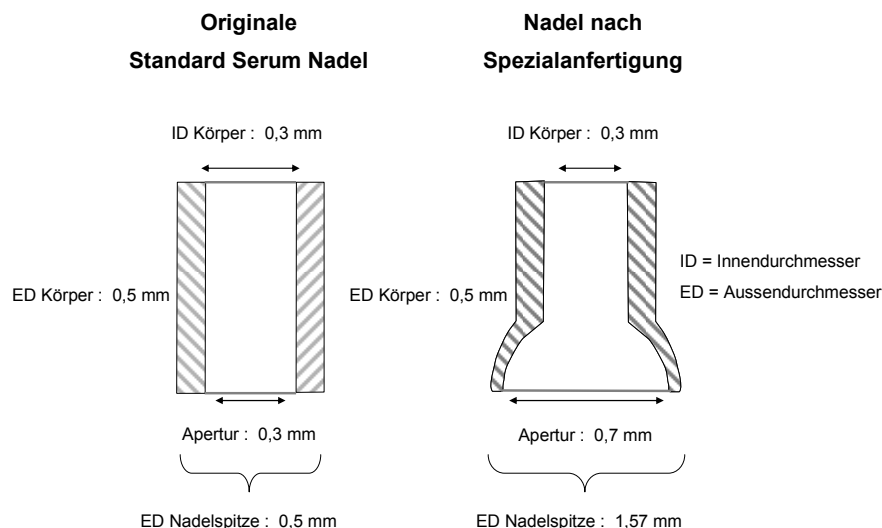


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Injektionsnadelgeometrien.

Ein wesentliches Ergebnis ist dabei, dass mit einer tulpenförmigen Apertur der Injektionsnadel die besten Ergebnisse erzielt werden. Ein Mischzyklus beginnt mit dem Aufziehen von Luft. Die Injektionsnadel befindet sich dabei außerhalb des Probengefäßes. Danach wird die Injektionsnadel soweit in das Probengefäß eingeführt, dass der Radius der erwarteten Luftblase kleiner ist als der Abstand zum Probengefäßboden. Die Luft wird nun mit hoher Geschwindigkeit in das Probengefäß eingeleitet. Die sedimentierte Probe wird aufgewühlt und effizient durchmischt. Die Effizienz der Durchmischung wurde durch zwei unabhängige Verfahren untersucht. Zum einen wurde die Erythrozytenzahl vor und nach dem Mischvorgang durch mikroskopische Auszählung bestimmt. Zum anderen wurde die Probe durch Drabkin's Reagenz lysiert und freigesetztes Hämoglobin photometrisch bestimmt. Entsprechende Aliquote wurden jeweils unterhalb der Schaumkrone entnommen.

Die Untersuchungsergebnisse für Parameter und Bedingungen, die zu einer 100%-igen Durchmischung führen, sind in Tabelle 5 aufgeführt:

Tabelle 5: Untersuchungsergebnisse: Parameter und Einstellungen für eine effiziente Probendurchmischung.

| Parameter | Einstellung / Bedingungen |
|----------------------------------|---|
| Nadeltyp | modifizierte Serumnadel mit möglichst großer Apertur |
| Probengefäß | schmal im unteren Bereich, kleinvolumig (optimal : konisch) |
| Injektionshöhe | je nach Luftblasengröße 1 - 5 mm vom Probengefäßboden |
| Injektionsgeschwindigkeit | höchste Stufe (Stufe 9) |
| Anzahl der Luftblasenstöße | 3 - 5 |
| Volumen einzelner Luftblasenstoß | 20 - 100 µL |

Für die Feineinstellung der Probenmisch-/Injektionseinheit müssen Wiederfindung, Reproduzierbarkeit, Schaumbildung und der Zeitfaktor gegeneinander abgewogen werden.

Während der Entwicklung einer geeigneten Methode für den Probenmischvorgang, wurde von der Firma Spark Holland begonnen, einen neuen Probengeber zu entwickeln. In diesen wird eine zusätzliche mechanische Mischeinheit integriert. Großer Vorteil hierbei ist das Einsparen von Zeit. Deshalb wurden die Untersuchungen zu dem hier vorgestellten alternativem Mischverfahren an dieser Stelle nicht weiter fortgesetzt.

Zugabe des Internen Standards als Korrekturfaktor für quantitative Analysen

Interne Standards werden zur Kompensierung von Probenunterschieden und –verlusten während der Analyse im System und zum Ausgleich der Extraktions- und Ionisationseffizienz eingesetzt [125]. Die Automatisierung seiner Zugabe stellt eine Herausforderung dar. Alle untersuchten Immunsuppressiva und ihre Internen Standards sind sehr hydrophob und lösen sich daher ausschließlich in organischen Lösemitteln. Die Zugabe einer größeren Menge an organischem Lösemittel zu einer Vollblutprobe resultiert jedoch in einer Fällung der Proteine. Kleinere Volumina an organischem Lösemittel (z.B. Methanol) lassen sich dagegen schlecht pipettieren. Abhilfe kann daher eine indirekte Zugabe des Internen Standards schaffen [7]. Dabei wird der Interne Standard zunächst in einem organischen Lösemittel gelöst, bevor er in Humanplasma der Blutgruppe AB eingebracht wird. Diese Mischung kann nun agglutinationsfrei einer Vollblutprobe hinzu pipettiert werden, da das Humanplasma weder Antikörper gegen Erythrozyten der Blutgruppe A noch gegen die der Blutgruppe B aufweist.

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, führt der Zusatz von organischem Lösemittel, insbesondere von DMSO, zu einer homogenen CDB Matrix. Der Zusatz des Internen Standards erfolgte daher als Lösung in DMSO. DMSO ist im Gegensatz zu anderen organischen Lösemitteln

relativ viskös und bereitet dadurch keine Probleme beim Pipettieren. Der Probengeber wird so programmiert, dass der in DMSO gelöste Interne Standard nach dem Mischvorgang zu der Vollblutprobe hinzu pipettiert wird.

Tabelle 6 enthält Angaben über Mischungen aus Vollblut/AB-Plasma und organischem Modifier, die alternativ in ein vollautomatisiertes Analysensystem injiziert und im Anschluss prozessiert werden können.

Tabelle 6: Zugabe des Internen Standards zu einer Vollblutprobe. Mischungen aus Vollblut/AB-Plasma und organischem Modifier für ein vollautomatisches Blutanalysensystem.

| | Vollblut [vol. %] | AB-Plasma [vol. %] | organischer Modifier | |
|------------------|-------------------|--------------------|----------------------|---------------|
| | | | ACN [vol. %] | DMSO [vol. %] |
| Probenmischung 1 | 50 | 45 | 5 | |
| Probenmischung 2 | 97,5 | | | 2,5 |

Um eine hohe Präzision zu gewährleisten, wird der Interne Standard, wie bei Hoffman et al. beschrieben, so früh wie möglich der untersuchten Probe zugesetzt [125]. Bei Methoden, die mit einer Proteinpräzipitation arbeiten, wird der Interne Standard im Fällungsreagenz zugegeben [230, 262]. Cushman-Vokoun et al. konnten nachweisen, dass der Interne Standard vom Hämatokrit nur gering beeinflusst wird. Der Hämatokrit einer Vollblutprobe ist daher bei der Quantifizierung vernachlässigbar [230, 269].

Optimierung des Injektionsmodus

Der Injektionsmodus einer Vollblutprobe wurde gegenüber Milojković dahingehend optimiert, dass das Vollblut nicht mit der mobilen Phase in Kontakt kommt [7]. Dadurch sollte eine Lyse der Erythrozyten vor der Prozessierung vermieden werden. Dies wurde dadurch erreicht, dass jeweils ein definiertes Luftpolster vor und nach der Probe aufgezogen wurde. Volumen und Aufziehggeschwindigkeit wurden dafür optimiert. Abbildung 35 zeigt den Unterschied zwischen einer segmentierten und einer nicht segmentierten Probe. Im linken Teilbild ist die Gesamtapparatur mit aufgezogener Probe zu sehen. In der Mitte ist der untere Probenteil vergrößert dargestellt. Innerhalb der Kapillaren erfolgte eine unerwünschte Durchmischung. Im rechten Teil ist der obere Probenteil vergrößert dargestellt. Hier ist das Lösemittel durch einen Luftabschnitt von der Probe abgetrennt.

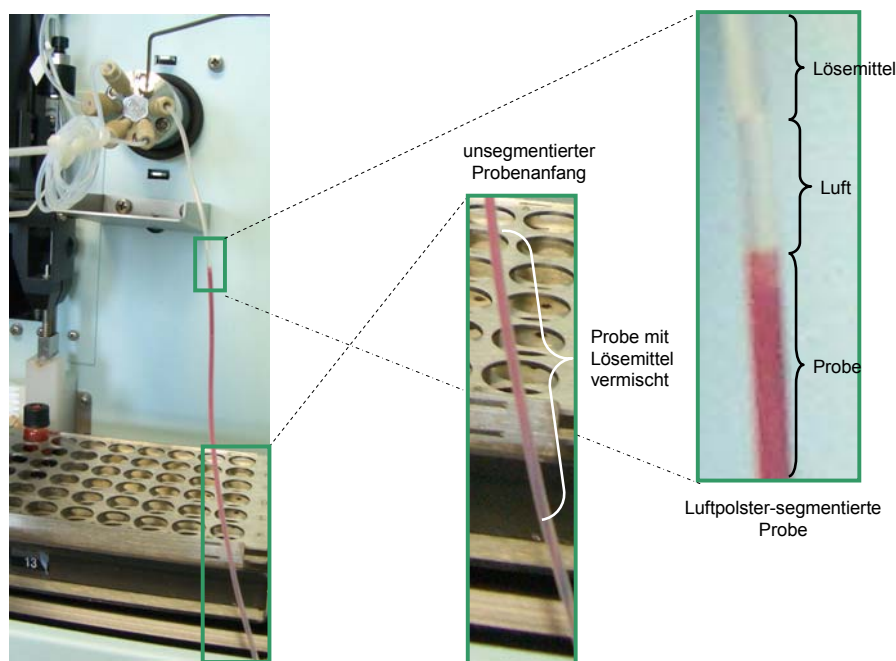


Abbildung 35: Modifizierter Injektionsmodus: Durch Luftpolster segmentierte Probe.

Wie in Kapitel 3.1 schon erwähnt, kommt es in den Kapillaren zu einer erheblichen Verdünnung der Vollblutprobe. Eine homogene CDB Matrix entsteht jedoch nur unter optimalen Prozessierungsbedingungen. Um die Bildung von „Ghosts“ durch hypotone Lyse zu vermeiden, ist es erforderlich, dass vor der in-line Prozessierung keine Durchmischung der Vollblutprobe mit der wässrigen mobilen Phase erfolgt.

Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen ist, dass eine durch Luftpolster-segmentierte Probe beim Injektionsvorgang nicht mit der mobilen Phase durchmischt wird. Dadurch wird – neben einer Verdünnung der Probe – die Bildung von „Ghosts“ durch eine hypotone Lyse vermieden. Das Volumen an Luft zwischen Lösemittel und Probe bestimmt ebenfalls die Durchmischung beider Medien. Zu den besten Resultaten führten eine sehr langsame Aufziehggeschwindigkeit und ein Luftvolumen von jeweils 5 μL . Dieses Volumen entspricht bei Verwendung einer Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,5mm ca. 0,5cm.

3.3.2 Beschreibung der In-line Prozessierung von Vollblutproben

Die in-line Prozessierung von antikoagulierten Vollblutproben wurde eingehend von Milojković beschrieben [7]. Für die in dieser Arbeit angewendete in-line Prozessierung wurden alle Verfahrensgrößen übernommen. Für Mischungen aus Vollblut und Internem Standard sind die Parameter in Tabelle 7 aufgeführt. Beispielsweise beträgt die optimale Beheizungszeit (t_{heat}) einer Vollblutprobe mit 2,5 vol% DMSO als organischer Modifier 13 Sekunden. Der entsprechende Fluss, der dafür eingestellt werden muss, berechnet sich aus dem Volumen der beheizten Edelstahlkapillare und der erwünschten Beheizungszeit (siehe Abbildung 36). In diesem Falle beträgt er 270 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Tabelle 7: Prozessparameter relevanter Probenmischungen und entsprechende Flussraten aus [7].

| | t_{heat} bei 75°C | Flussrate [$\mu\text{L}/\text{min}$] |
|--|----------------------------|--|
| Vollblut | 16 | 220 |
| Mischung 1 : Vollblut / AB-Plasma / ACN (50/45/5, v/v/v) | 6 | 590 |
| Mischung 2 : Vollblut / DMSO (97,5/2,5, v/v/v) | 13 | 270 |

$$\text{Flussrate } [\mu\text{L}/\text{min}] = \frac{\text{Volumen beheizte Kapillare } [\mu\text{L}]}{t_{\text{heat}} [\text{sec}]} \times 60$$

Abbildung 36: Formel zur Berechnung der Flussrate für eine in-line Prozessierung. Allgemeingültig für die Prozessierung einer Vollblutprobe bzw. eine Vollblutprobenmischung in der beheizten Edelstahlkapillare [7].

3.3.3 Entwicklung und Kopplung einer Methode zur Aufbereitung einer Prozessierten Vollblutprobe (CDB) mittels on-line SPE

Die Probenaufbereitung hat entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität, die Reproduzierbarkeit oder den Durchsatz eines analytischen Systems. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Entwicklung eines SPE-Verfahrens für die Aufreinigung einer Vollblutprobe. Dieses Verfahren hat im Wesentlichen drei Ziele: (1.) die Entfernung von Proteinen, welches die analytische Säule kontaminieren; (2.) die Abtrennung weiterer Matrixbestandteile wie (Phospho-)Lipide, die Suppression oder Verstärkung der Ionisation verursachen können; (3.) die Aufkonzentrierung der Analyte zur Steigerung der Sensitivität der Methode.

In der Routineanalytik von Immunsuppressiva aus Vollblut erfolgt die Probenaufbereitung über eine Proteinpräzipitation. Der Überstand des Präzipitats wird anschließend zusätzlich über eine Oasis[®] HLB-SPE-Säule mittels Säulenschaltung aufgereinigt. Bei diesem Verfahren werden starke Matrixeffekte mit Hilfe der Nachsäuleninfusionstechnik nachgewiesen. Für die komplexeren Anforderungen, wie die Bestimmung aus Vollblut mit integrierter in-line Prozessierung, ist das Routineverfahren daher nicht selektiv und robust genug. Ziel war es deshalb, eine Beseitigung potentiell interferierender Matrixbestandteile zu erreichen. Damit wird eine ungestörte Trennung und Quantifizierung der Analyte garantiert. Ergebnis ist eine Methode mit einer multidimensionalen Probenaufbereitung über mehrere SPE-Säulenmaterialien. Dies wurde mit Hilfe von Säulenschaltungen erreicht. Eine solche multidimensionale Probenaufbereitung konnte bereits früher für basische Arzneistoffe aus Plasma und Urin ausgearbeitet werden [80, 145].

3.3.3.1 Auswahl geeigneter SPE- Sorbentien und mobiler Phasen

Die SPE-Sorbentien wurden so gewählt, dass eine Analysenplattform für alle derzeit applizierten Immunsuppressiva entwickelt werden konnte. Die Elutionskraft der Beladungs- bzw. Waschlösemittel für jedes SPE-Material wurden so gewählt, dass Interferenzen

möglichst ohne Verlust der Zielanalyte abgetrennt werden. Gleichzeitig sollte die Stärke des Lösemittels für die Elution von der jeweiligen SPE-Säule / Kartusche so gering sein, dass nur die Zielanalyte transferiert werden. Der pH-Wert wurde gegebenenfalls so eingestellt, dass die Analyte möglichst quantitativ reteniert werden. Die Desorption der Zielanalyte wird dann durch Veränderung des pH-Wertes erreicht.

3.3.3.2 Bestimmung von Kenngrößen für die Aufreinigung von biologischen Matrices

Für die Programmierung des Aufbereitungsschrittes einer CDB-Probe mit Hilfe einer on-line Säulenschaltung, erfolgte die Bestimmung und Berechnung der Kenngrößen in Anlehnung an Major et al. (siehe Kapitel 2.2.1.3 Säulenschalten (column switching)) [82]. Für die Programmierung des verwendeten Analysensystems werden jedoch die entsprechenden Volumina der so bestimmten Kenngrößen benötigt. Dies sind die Durchbruchsvolumina (V_B) statt der Durchbruchzeiten (t_A) der Analyte, die Fraktionierungsvolumina (V_F) statt der Fraktionierungszeiten der Matrix und die Elutionsvolumina (V_E) statt Elutionszeiten (t_T) der Analyte. Daher werden die ermittelten Zeiten in Volumina umgerechnet. Für die beschriebene MD-SPE Plattform wurden die Kenngrößen für alle SPE-Kartuschen separat bestimmt.

3.3.3.2.1 Bestimmung des Durchbruchsvolumens (V_B) der Analyten

Zur Ermittlung der Ventilschaltzeiten für die Probenaufbereitung mit Hilfe einer Säulenschaltung muss u.a. das Durchbruchsvolumen der Analyte auf den Säulenmaterialien bestimmt werden. Die Bestimmung der Durchbruchzeit bzw. des Durchbruchsvolumens erfolgt wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben. Zur Bestimmung wird eine Standardlösung, die alle untersuchten Analyte enthält, injiziert und das Elutionsprofil aller Analyte mit einem Massenspektrometer detektiert. Gemessen werden dabei gleichzeitig die Massenübergänge

aller Analyten im MRM-Modus. Hierbei wird die hohe Selektivität des Massenspektrometers ausgenutzt. Im Gegensatz dazu ist eine UV-Detektion nachteilig. Einige Zielanalyte besitzen ihr Absorptionsmaximum in einem Wellenlängenbereich, der stark durch Eigenabsorption der Lösemittel beeinflusst wird. Beispielsweise liegt der „UV-cut-off“ für Methanol bei 205nm. Ciclosporin A und Tacrolimus besitzen ihr Adsorptionsmaximum unter 200nm. Everolimus und Sirolimus besitzen ähnliche Absorptionsmaxima wie die Proteine. Das Absorptionsmaximum der Proteine wird bei der Bestimmung der Matrixfraktion (Fraktionierungsvolumen) genutzt. In diesem Fall kann der Detektor nicht zwischen Analyt und Matrix unterscheiden. Die Differenzierung zwischen Analyt- und Matrixfraktion in einer Patientenprobe ist daher mit einem UV-Detektor erschwert. Für die Bestimmung der Durchbruchzeiten wird jeweils der gleiche Eluent verwendet, der später auch für die Bestimmung des Fraktionierungsvolumens verwendet wird.

Bestimmung des Durchbruchvolumens (V_B) auf der ersten SPE-Kartusche

Abbildung 37 zeigt ein repräsentatives Durchbruchprofil der Immunsuppressiva und deren Internen Standards beispielhaft auf einer LiChrospher[®] ADS RP4-Kartusche, gemessen mit einem Massenspektrometer. Da diese stationäre Phase / Kartusche bisher nicht kommerziell angeboten wird, wurde diese in einer Sonderanfertigung der Firma Spark Holland in das verwendete Kartuschenformat gepackt. Das Chromatogramm weist eine gleichmäßige Basislinie über den gesamten Meßzeitraum auf. Da kein Signal detektiert werden konnte, ist bewiesen, dass unter diesen Bedingungen kein Analyt von der Kartusche eluiert wird. Ebenfalls wurden eine HySphere C2-, eine HySphere C8-, eine HySphere C8 EC-SE-, eine HySphere C18- und eine Oasis[®] HLB Kartusche, alle mit denselben Dimensionen, getestet. Alle genannten Kartuschen zeigen Durchbruchprofile, die nur aus Basislinien bestehen (nicht gezeigt). Daraus ergeben sich auf allen getesteten Materialien Durchbruchsvolumina von mindestens 90mL.

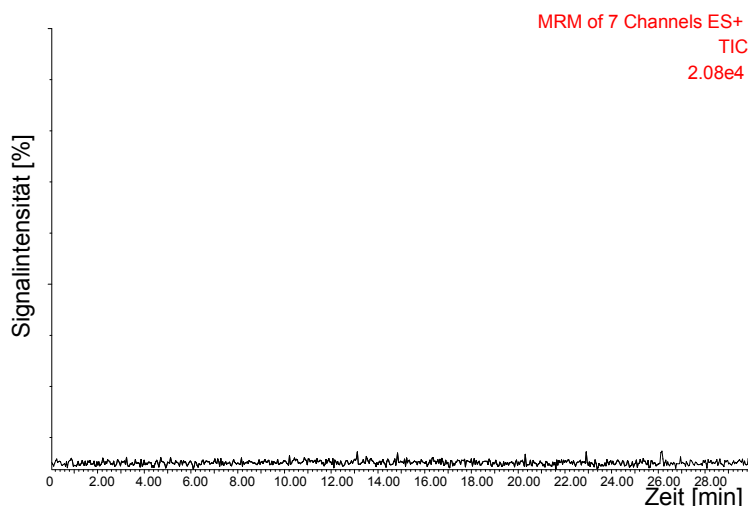


Abbildung 37: Bestimmung des Durchbruchvolumens auf der ersten SPE-Kartusche. Probe: Standardlösung der untersuchten Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards; Konzentration 100ng/mL pro Analyt; Injektionsvolumen: 25µL; SPE-Kartusche: LiChrospher® ADS RP4 (10x2mm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril (95/5, v/v); Fluss: 3mL/min; MS-Detektion: MRM aller Analyte und der Internen Standards.

Bestimmung des Durchbruchvolumens (V_B) auf der zweiten SPE-Kartusche

Abbildung 38 zeigt das Durchbruchprofil der Immunsuppressiva und der Internen Standards auf einer ProntoSil PLR-Kartusche, gemessen mit einem Massenspektrometer. Diese zweite Kartusche ist hinter und damit zeitlich nach die LiChrospher® ADS RP4-Kartusche geschaltet. Auch dieses Material wird nicht kommerziell im Kartuschenformat angeboten. Diese stationäre Phase wurde ebenfalls als Sonderanfertigung der Firma Spark Holland in das verwendete Kartuschenformat gepackt. Das Chromatogramm weist eine gleichmäßige Basislinie über den gesamten Meßzeitraum auf. Da kein Signal detektiert werden konnte, ist ebenfalls bewiesen, dass unter diesen Bedingungen kein Analyt von der Kartusche eluiert wird. Der Start der Fraktionierung auf der zweiten Kartusche ist nicht identisch mit dem Start des Chromatogramms. Der eigentliche Start ist nicht erkennbar und liegt bei ca. 8 Minuten. Daraus ergibt sich ein Durchbruchvolumen von mindestens 66mL.

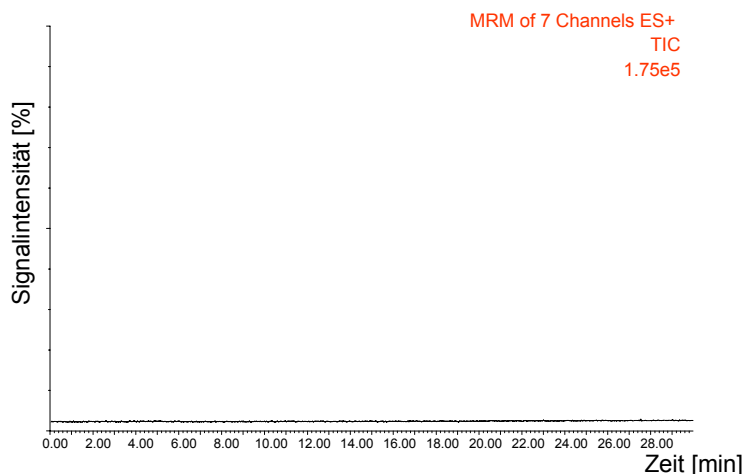


Abbildung 38: Bestimmung des Durchbruchsvolumens auf der zweiten SPE-Kartusche. Probe: Standardlösung der untersuchten Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards; Konzentration 100ng/mL pro Analyt; Injektionsvolumen: 25µL; SPE-Kartusche: ProntoSil PLR (10x2mm); mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 (20/80, v/v); Fluss: 3mL/min; MS-Detektion: MRM aller Analyte und der Internen Standards; die Probe wurde zuvor auf einer LiChrospher® ADS RP4-Kartusche (10x2mm) fraktioniert (Parameter siehe Anhang 9, Teilschritt 1).

Bestimmung des Durchbruchsvolumens (V_B) auf der dritten SPE-Kartusche

Abbildung 39 zeigt das Durchbruchprofil der Immunsuppressiva und der Internen Standards auf einer Oasis® MCX-Kartusche, gemessen mit einem Massenspektrometer. Die Bestimmung erfolgt zeitlich nach vollständiger Fraktionierung auf der LiChrospher® ADS RP4- und der ProntoSil PLR-Kartusche.

Das Chromatogramm weist eine gleichmäßige Basislinie über den gesamten Meßzeitraum auf. Unter den genannten Bedingungen wird demnach kein Analyt von der Kartusche eluiert. Der Start der Fraktionierung beginnt bei ca. vier Minuten nach Beginn der Detektion. Daraus ergibt sich ein Durchbruchsvolumen von mindestens 26mL.

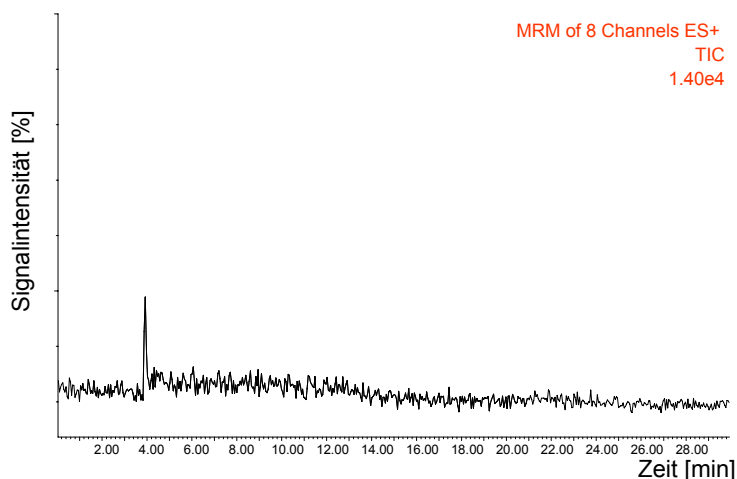


Abbildung 39: Bestimmung des Durchbruchvolumens auf der dritten SPE-Kartusche. Probe: Standardlösung der untersuchten Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards; Konzentration 100ng/mL pro Analyt; Injektionsvolumen: 25µL; SPE-Kartusche: Oasis[®] MCX (10x2mm); mobile Phase: 20/80 Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 (v/v); Fluss: 1mL/min; MS-Detektion: MRM aller Analyte und der Internen Standards; die Probe wurde zuvor auf einer LiChrospher[®] ADS RP4-Kartusche (10x2mm) und auf einer ProntoSil PLR-Kartusche (10x2mm) fraktioniert (Parameter siehe Anhang 9, Teilschritte 1-4).

Für die dritte Kartusche wurden SPE-Materialien untersucht, welche zum einen die niedermolekulare Matrixfraktion eliminieren bzw. verringern, zum anderen aber auch die Analyte extrahieren. Deshalb wurden Materialien getestet, die orthogonal zu den Trennmechanismen der ersten Kartusche sind. Dafür sind Kationenaustauscher bzw. „mixed-mode“ Materialien besonders geeignet. Auch HILIC-Materialien wurden untersucht. Beide getesteten HILIC-Materialien, Strata NH₂ und Strata Si-1 Silica der Firma Phenomenex, zeigten bei der Matrix CDB jedoch keinen weiteren Abreicherungsseffekt. Zur optimalen Wahl des Kationenaustauschers wurden die pK_A-Werte der Immunsuppressiva aus der Literatur herangezogen. Es konnten jedoch nur Näherungswerte mit Hilfe einschlägiger Berechnungssoftware ermittelt werden. Die Berechnungsergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: pK_A-Werte der untersuchten Immunsuppressiva [270].

| | pK _A | Bemerkung |
|---------------------|-----------------|---|
| Tacrolimus | 9,97 ± 0,70 | |
| Ascomycin | 9,97 ± 0,70 | |
| Sirolimus | 10,40 ± 0,70 | |
| Everolimus | 10,40 ± 0,70 | |
| Desmethoxysirolimus | 10,40 ± 0,70 | |
| Ciclosporin A | k. A. | nach Bestimmung auf einer C18 Säule wahrscheinlich > 10,4 |
| Ciclosporin D | k. A. | nach Bestimmung auf einer C18 Säule wahrscheinlich > 10,4 |

Die errechneten pK_A-Werte liegen im Grenzbereich der Nutzung von schwachen bzw. starken Kationenaustauschern. Mit den vom Kartuschen-Hersteller empfohlenen Lösemitteln konnten die Immunsuppressiva auf den „mixed-mode“ Materialien nicht extrahiert werden. Die Probe wurde daher mit Hilfe der mobilen Phase stark angesäuert und gepuffert. Obwohl bereits von Buech et al. für Sirolimus beschrieben wurde, dass diese Substanz im pH-Bereich von 1-10 keine ionisierbaren funktionellen Gruppen aufweist [271], konnten alle Analyte mit dem Eluenten L3 [Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit einem pH-Wert von 2,8 (20/80, v/v)] auf einer Oasis[®] MCX-Kartusche extrahiert werden.

Tabelle 9 zeigt die Zusammenstellung aller ermittelten Durchbruchzeiten und die daraus berechneten Volumina auf den einzelnen SPE-Kartuschen.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse: Durchbruchzeiten und die daraus berechneten Durchbruchvolumina. Untersuchung der Immunsuppressiva und der Internen Standards auf verschiedenen SPE-Materialien in Abhängigkeit von mobiler Phase und Fluss.

| | mobile Phase | t _A [min] | Fluss [mL/min] | V _B [mL] |
|--|---|----------------------|----------------|---------------------|
| 1. SPE - Kartusche : LiChrospher [®] ADS C4 | Wasser / ACN (95/5, v/v) | > 30 | 3 | > 90 |
| 1. SPE - Kartusche : HySphere C2 | Wasser / ACN (95/5, v/v) | > 30 | 3 | > 90 |
| 1. SPE - Kartusche : HySphere C8 | Wasser / ACN (95/5, v/v) | > 30 | 3 | > 90 |
| 1. SPE - Kartusche : HySphere C8 EC-SE | Wasser / ACN (95/5, v/v) | > 30 | 3 | > 90 |
| 1. SPE - Kartusche : HySphere C18 | Wasser / ACN (95/5, v/v) | > 30 | 3 | > 90 |
| 1. SPE - Kartusche : Oasis [®] HLB | Wasser / ACN (95/5, v/v) | > 30 | 3 | > 90 |
| 2. SPE - Kartusche : Prontosil C30 | MeOH / NH ₄ formiat, pH = 2,8 (20/80, v/v) | > 22 | 3 | > 66 |
| 3. SPE - Kartusche : Oasis [®] MCX | MeOH / NH ₄ formiat, pH = 2,8 (20/80, v/v) | > 26 | 1 | > 26 |

Die ermittelten Durchbruchvolumina auf allen Kartuschen sind so hoch, dass eine ausreichende Fraktionierung auf jedem getesteten Material möglich ist.

3.3.3.2.2 Bestimmung der Fraktionierungsvolumina (V_F) der Probenmatrix

Zur Ermittlung der Ventilschaltzeiten für die Probenaufbereitung mit Hilfe einer Säulenschaltung muss das Fraktionierungsvolumen der Analyte auf den SPE-Packungsmaterialien bestimmt werden. Die Bestimmung der Fraktionierungszeit bzw. des Fraktionierungsvolumens erfolgt wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben. Die Bestimmung geschieht mit demselben instrumentellen Aufbau, mit dem bereits die Bestimmung des Durchbruchvolumens durchgeführt wurde. Im Gegensatz zur Bestimmung des Durchbruchvolumens wird für diese Untersuchungen jedoch eine analytfreie Matrixprobe injiziert und das Elutionsprofil von Matrixsubstanzen detektiert. Auch hierbei wird in der Regel die hohe Selektivität des Massenspektrometers ausgenutzt. Gemessen werden dabei gleichzeitig die Massenübergänge aller Analyte im MRM-Modus. Bei der stark Matrix-belasteten primären Probe (CDB) wird das Fraktionierungsvolumen auf der ersten SPE-Kartusche mittels UV-Detektion bestimmt. Für die Bestimmung der Fraktionierungsvolumina wird jeweils der gleiche Eluent verwendet, der bereits zuvor für die Bestimmung des Durchbruchvolumens verwendet wurde.

Bestimmung des Fraktionierungsvolumens (V_F) auf der ersten SPE-Kartusche

Das Massenspektrometer wurde für die Bestimmung der Fraktionierungszeit (t_M) auf der ersten SPE-Kartusche durch einen UV-Detektor ersetzt. Aus Vorversuchen folgt, dass das Hämoglobin unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen erst nach der Hauptfraktion der Proteine eluiert wird. Die Messung erfolgte deshalb beim Absorptionsmaximum für Hämoglobin (430nm). So kann sichergestellt werden, dass schon auf der ersten Kartusche so viel Matrix wie möglich abgereichert wird.

Die Bestimmung erfolgte durch Injektion einer unbehandelten Matrixprobe (CDB) auf die erste SPE-Kartusche. Getestet wurden eine LiChrospher[®] ADS RP4-, eine HySphere C2-, eine HySphere C8-, eine HySphere C8 EC-SE-, eine HySphere C18- und eine Oasis[®] HLB Kartusche, alle mit den Dimensionen 10x2mm.

Abbildung 40 zeigt die Überlagerung repräsentativer Elutionsprofile der makromolekularen Matrixbestandteile einer CDB-Probe auf allen getesteten SPE-Materialien. Nach ca. einer

Minute erreicht das UV-Signal bei 430nm wieder die Ausgangsintensität. Danach wird kein Hämoglobin mehr detektiert. Unter den gegebenen Bedingungen kann daher abgeleitet werden, dass die Matrix einer CDB-Probe auf allen getesteten SPE-Materialien innerhalb einer Minute vollständig fraktioniert wird. Das orangefarbene Profil der LiChrospher® ADS RP4-Kartusche erreicht im Vergleich zu den anderen Kartuschen die Basislinie früher. Auf diesem Material ist demnach eine etwas kürzere Fraktionierungszeit erforderlich. Das Fraktionierungsvolumen berechnet sich auf 3mL.

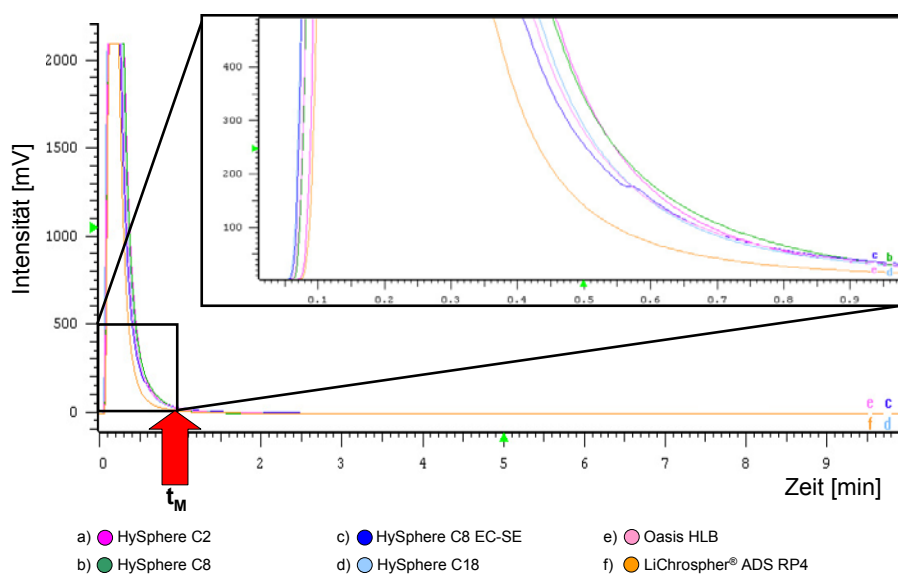


Abbildung 40: Ergebnis der Bestimmung des Fraktionierungsvolumens auf verschiedenen SPE-Kartuschen. Probe: off-line hergestelltes CDB; Injektionsvolumen: 25µL; SPE-Kartuschen: HySphere C2 (10x2mm), HySphere C8 (10x2mm), HySphere C8 EC-SE (10x2mm), HySphere C18 (10x2mm), Oasis® HLB (10x2mm), LiChrospher® ADS RP4 (10x2mm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril (95/5, v/v); Flussrate: 3mL/min; UV-Detektion: 430nm.

Der verwendete Eluent L1 [Wasser/Acetonitril (95/5, v/v)] entspricht dem Eluenten, der auch bei der Bestimmung der Durchbruchzeit verwendet wurde. Dieser Eluent wurde bewusst so gewählt, da er bei der Anwendung in der Umkehrphasenchromatographie nur schwache Elutionskraft besitzt. Durch den geringen Zusatz von Acetonitril wird sichergestellt, dass die Analyte zwar aus ihren Proteinbindungen freigesetzt werden, es jedoch zu keiner Proteinpräzipitation kommt. Die Aufnahme des Elutionsprofils der makromolekularen Probenmatrix erfolgt mit einer möglichst hohen Flussrate, da das Größenausschlussprinzip bei den Copolymer-Materialien erst bei höheren Flussraten einsetzt. Gleichzeitig wurde bei der Methodenentwicklung immer auch der Zeitfaktor berücksichtigt.

Zur Optimierung der Fraktionierung auf der ersten Kartusche wurde in einem zweiten Versuchsaufbau untersucht, ob nach der Hämoglobinfraction noch (Phospho-)Lipide eluiert werden. Dazu wurde der UV-Detektor durch ein Massenspektrometer ersetzt. Die Detektion der Phospholipide erfolgte mit der Methode nach Little et al. [141]. Dafür wurde die MRM-Methode der Modellanalyte und der Internen Standards um einen weiteren, für (Phospho-)Lipide spezifischen Massenübergang (MRM: $m/z184 \rightarrow m/z184$), erweitert. Die gleiche Versuchsreihe wurde mit dem abgeänderten instrumentellen Aufbau noch einmal durchgeführt. Zur Entlastung des Massenspektrometers wurden die ersten 3mL des Eluats, das die Hämoglobinfraction beinhaltet, in den Abfall gespült.

Eine wesentliche Erkenntnis dieser Untersuchungen war, dass sich eine Elution an (Phospho-)Lipiden mit dem Fraktionierungseluenten L1 [Wasser/Acetonitril (95/5, v/v)] zeigte. Diese Fraktion an (Phospho-)Lipiden ist daher hydrophil einzustufen. Phospholipide dieser Kategorie können bekanntermaßen zu Matrixeffekten kurz nach dem Injektionssignal führen. Da jedoch das Durchbruchvolumen der Zielanalyte unter den gegebenen Bedingungen auf der gleichen SPE-Kartusche sehr hoch ist, ist eine Fraktionierung der hydrophilen (Phospho-)Lipide möglich. Infolgedessen wurde dafür auf der ersten SPE-Kartusche ein zusätzlicher Waschschrift eingebaut. Dafür wurde der Anteil an Acetonitril auf 25% erhöht und so die Elution dieser (Phospho-)Lipidfraktion erreicht. Eine gute Abreicherung wurde mit mindestens 6mL einer Mischung aus Wasser/Acetonitril (75/25, v/v) erzielt.

Bestimmung des Fraktionierungsvolumens (V_F) auf der zweiten SPE-Kartusche

Die Bestimmung der Fraktionierungszeit (t_M) auf der zweiten SPE-Kartusche erfolgt wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben. Dafür wird ein Massenspektrometer verwendet. Detektiert werden die MRM-Übergänge der Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards sowie der (Phospho-)Lipide. Letztere werden mit einem für diese Verbindungen selektiven Massenübergang (MRM: $m/z184 \rightarrow m/z184$) detektiert. Die Bestimmung erfolgt durch Injektion einer unbehandelten Matrixprobe auf die erste SPE-Kartusche (LiChrospher® ADS RP4). Nach vollständiger Fraktionierung auf der ersten Kartusche wird das Fraktionierungsprofil auf der nachgeschalteten zweiten Kartusche (ProntoSil PLR-Material) untersucht. Die Fraktionierung auf der zweiten Kartusche findet mit einem Eluenten niedrigerer Elutionskraft statt als der Eluent besitzt, mit dem die erste Kartusche gewaschen wird. Das ProntoSil PLR

Material, wie auch das LiChrospher® ADS RP4 Material sind Umkehrphasen. Daher erfolgt auf der zweiten Kartusche unter diesen Bedingungen keine weitere Fraktionierung. Zweck des Einbaus des ProntoSil PLR-Materials als zweite SPE-Kartusche war die Abtrennung hydrophober (Phospho-)Lipidfraktionen von den Analyten. Die Retention der hydrophoben (Phospho-)Lipide beruht auf der molekularen Formerkennung durch die stationäre Phase, d.h. die PLR Alkylketten.

Abbildung 41 zeigt das Fraktionierungsprofil auf einer ProntoSil PLR-Kartusche, nachdem die CDB-Probe bereits auf der LiChrospher® ADS RP4-Kartusche vorfraktioniert wurde. Das Chromatogramm zeigt ein gleichmäßiges Basissignal über den kompletten Detektionszeitraum. Dies bedeutet, dass es vorerst zu keiner weiteren Abreicherung der Matrix auf dem ProntoSil PLR-SPE-Material kommt. Gleichzeitig bestätigt dieses Chromatogramm die Vollständigkeit der Fraktionierung auf der LiChrospher® ADS RP4-Kartusche.

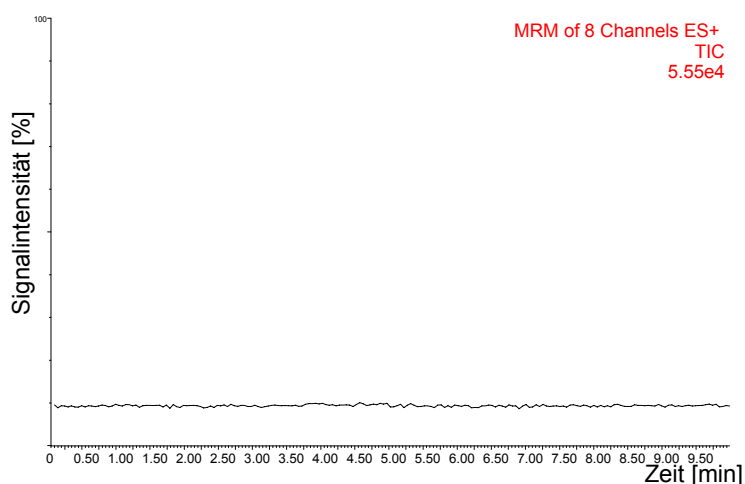


Abbildung 41: Bestimmung des Fraktionierungsvolumens auf der zweiten SPE-Kartusche. Probe: off-line hergestelltes CDB; Injektionsvolumen: 25µL; SPE-Kartusche: ProntoSil PLR (20x2mm); mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung, pH=2,8 (20/80, v/v); Flussrate: 2,45mL/min; MS-Detektion: MRM aller Analyte und der Internen Standards plus MRM m/z 184→m/z 184; die Probe wurde zuvor auf einer LiChrospher® ADS RP4-Kartusche (10x2mm) fraktioniert (Parameter siehe Anhang 9, Teilschritt 1).

Bedingt durch den Transfer der Analyte von der LiChrospher® ADS RP4-Kartusche auf die ProntoSil PLR-Kartusche kommt es auf der zuletzt genannten Kartusche gleichzeitig zu einer 3-minütigen Fraktionierung. Dabei beträgt das Fraktionierungsvolumen 7,35mL und setzt sich aus dem Transferlösemittel der LiChrospher® ADS RP4-Kartusche [20vol.% Methanol] und dem Lösemittel zur in-line Verdünnung [80vol.% 10mmol Ammoniumformiatlösung mit

pH=2,8 (20/80, v/v)] zusammen. Da unter diesen Bedingungen jedoch keine weitere Abreicherung der Matrix erfolgt, wird auf der ProntoSil PLR-Kartusche keine zusätzliche Fraktionierungszeit benötigt. Das zusätzliche Fraktionierungsvolumen berechnet sich daher ebenfalls auf null.

Bestimmung des Fraktionierungsvolumens (V_F) auf der dritten SPE-Kartusche

Die Bestimmung der Fraktionierungszeit (t_M) auf der dritten SPE-Kartusche erfolgt wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben. Das Elutionsprofil der niedermolekularen Restmatrix wird mit einem Massenspektrometer aufgenommen. Detektiert werden ebenfalls die MRM-Übergänge der untersuchten Immunsuppressiva, der Interne Standards sowie der (Phospho)-Lipide. Die Bestimmung erfolgt durch Injektion einer unbehandelten Matrixprobe (CDB) auf die erste SPE-Kartusche. Nach vollständiger Fraktionierung auf der LiChrospher[®] ADS RP4- und der ProntoSil PLR-Kartusche wird das Fraktionierungsprofil auf einer Oasis[®] MCX-Kartusche untersucht. Die Fraktionierung auf dieser dritten Kartusche findet mit demselben Eluenten statt, mit dem die Probe auf der ProntoSil PLR-Kartusche vorfraktioniert wurde. Durch den orthogonalen Retentionsmechanismus wird auf dieser Kartusche eine weitere Abreicherung von niedermolekularen Matrixbestandteilen erwartet.

Abbildung 42 zeigt das Fraktionierungsprofil auf einer Oasis[®] MCX-Kartusche, nachdem die Probe bereits auf der LiChrospher[®] ADS RP4- und der ProntoSil PLR-Kartusche vorfraktioniert wurde. Das Chromatogramm zeigt ein gleichmäßiges Signal über den kompletten Detektionszeitraum.

Bedingt durch den Transfer der Analyte von der ProntoSil PLR-Kartusche auf die Oasis[®] MCX-Kartusche kommt es auf der zuletzt genannten Kartusche gleichzeitig zu einer 3-minütigen Fraktionierung. Dabei beträgt das Fraktionierungsvolumen 6mL und setzt sich aus dem Transferlösemittel der LiChrospher[®] ADS RP4-Kartusche [25vol.% Methanol/-10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 (75/25, v/v)] und dem Lösemittel zur in-line Verdünnung [75vol.% 10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8] zusammen. Unter diesen Bedingungen wird auf der Oasis[®] MCX-Kartusche keine weitere Abreicherung der Matrix detektiert. Daher wird auf dieser Kartusche keine zusätzliche Fraktionierungszeit benötigt. Das zusätzliche Fraktionierungsvolumen berechnet sich daher ebenfalls auf null.

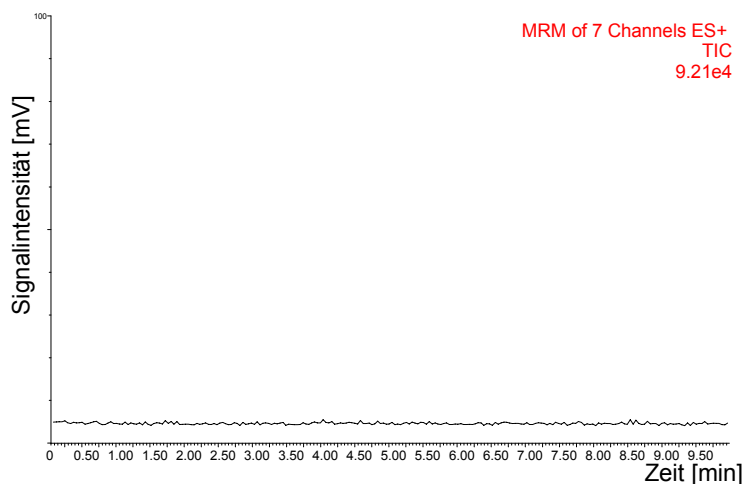


Abbildung 42: Bestimmung des Fraktionierungsvolumens auf der dritten SPE-Kartusche. Probe: off-line hergestelltes CDB; Injektionsvolumen: 25 μ L; SPE-Kartusche: Oasis[®] MCX, 10x1mm; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung, pH=2,8 (80/20, v/v); Flussrate: 1mL/min; MS-Detektion: MRM aller Immunsuppressiva und der Internen Standards sowie MRM m/z 184 \rightarrow m/z 184 (Phospholipide); die Probe wurde zuvor auf einer LiChrospher[®] ADS RP4-Kartusche (10x2mm) und auf einer ProntoSil PLR-Kartusche (10x2mm), fraktioniert (Parameter siehe Anhang 9, Teilschritt 1-5).

Auf der dritten SPE-Kartusche wird eine Abreicherung der Matrix bezüglich ihrer niedermolekularen anionischen und neutralen Bestandteile erwartet. Diese Abreicherung konnte mit dem verwendeten Versuchsaufbau nicht gezeigt werden. Die Notwendigkeit dieser Kartusche für eine störungsfreie Analyse von Immunsuppressiva in CDB konnte aber in weiterführenden Untersuchungen gezeigt werden (siehe Kapitel 3.4.6).

Bei der Methodenentwicklung wurde darauf geachtet, dass sowohl makromolekulare als auch niedermolekulare Matrixbestandteile abgereichert werden. Bei der Analytik von Arzneistoffen aus Plasma, Serum und Urin wurde gezeigt, dass sich auch niedermolekulare Probenbestandteile negativ auf die Analyse auswirken können und daher abgetrennt werden müssen [80].

Tabelle 10 zeigt die Zusammenstellung aller ermittelten Fraktionierungszeiten und die daraus berechneten Fraktionierungsvolumina.

Tabelle 10: Fraktionierungszeiten für die untersuchte Matrix CDB auf den einzelnen SPE-Kartuschen in Abhängigkeit von mobiler Phase und Fluss und die daraus berechneten Fraktionierungsvolumina.

| | mobile Phase | t_R [min] | Fluss [mL/min] | V_F [mL] |
|--|--|-------------|-------------------|------------|
| 1. SPE - Kartusche : LiChrospher® ADS C4 | Wasser / ACN (95/5, v/v) | 1 | 3 | 3 |
| 1. SPE - Kartusche : HySphere C2 | Wasser / ACN (95/5, v/v) | 1 | 3 | 3 |
| 1. SPE - Kartusche : HySphere C8 | Wasser / ACN (95/5, v/v) | 1 | 3 | 3 |
| 1. SPE - Kartusche : HySphere C8 EC-SE | Wasser / ACN (95/5, v/v) | 1 | 3 | 3 |
| 1. SPE - Kartusche : HySphere C18 | Wasser / ACN (95/5, v/v) | 1 | 3 | 3 |
| 1. SPE - Kartusche : Oasis® HLB | Wasser / ACN (95/5, v/v) | 1 | 3 | 3 |
| 2. SPE - Kartusche : ProntoSil C30 | MeOH / $\text{NH}_4\text{formiat}$, pH = 2,8 (20/80, v/v) | 0 | 3 | 0 |
| 3. SPE - Kartusche : Oasis® MCX | MeOH / $\text{NH}_4\text{formiat}$, pH = 2,8 (20/80, v/v) | 0 | 1 | 0 |

Die ermittelten Fraktionierungsvolumina auf der ersten und dritten Kartusche sind wesentlich kleiner als die korrespondierenden Durchbruchsvolumina. Sie erfüllen demnach alle Bedingungen von Major et al. [272].

3.3.3.2.3 Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) der Analyten von der SPE-Kartusche

Zur Ermittlung der Ventilschaltzeiten für die Aufbereitung einer CDB Probe mit Hilfe einer Säulenschaltung muss u.a. das Elutionsvolumen der Analyte auf den Säulenmaterialien bestimmt werden. Die Bestimmung der Elutionszeit bzw. des Elutionsvolumens erfolgt wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben. Zur Bestimmung erfolgt die Injektion einer Standardlösung, die alle untersuchten Analyten enthält. Im Anschluss daran wird das Elutionsprofil aller Analyte mit einem Massenspektrometer detektiert. Gemessen werden dabei gleichzeitig die Massenübergänge aller Analyten im MRM-Modus. Hierbei wird wiederum die hohe Selektivität des Massenspektrometers ausgenutzt. Für die Bestimmung der Transferzeiten wird im Vergleich zur Bestimmung von Durchbruchs- und Fraktionierungszeiten jeweils ein Eluent mit höherer Elutionskraft verwendet. So kann die Elution der Analyte in einem kürzeren Zeitraum erfolgen.

Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) auf der ersten SPE-Kartusche

Abbildung 43 zeigt ein repräsentatives Elutionsprofil aller untersuchten Analyte und der Internen Standards beispielhaft auf einer LiChrospher® ADS RP4-Kartusche, gemessen mit einem Massenspektrometer. Die injizierte Probe wurde zuvor auf derselben Kartusche fraktioniert und gewaschen. Das Chromatogramm zeigt ein scharfes Signal zwischen 3,6 und 4,2 Minuten. Der Beginn der Detektion korrespondiert nicht mit dem Start der Analyse. Dieser liegt bei ca. 3,5 Minuten. Daraus ergibt sich eine Elution innerhalb kurzer Zeit. Es ergibt sich ein Elutionsvolumen von 1,8mL. In der Aufgliederung in die einzelnen Spuren wird die Elution jedes einzelnen Analyten bzw. der Internen Standards deutlich.

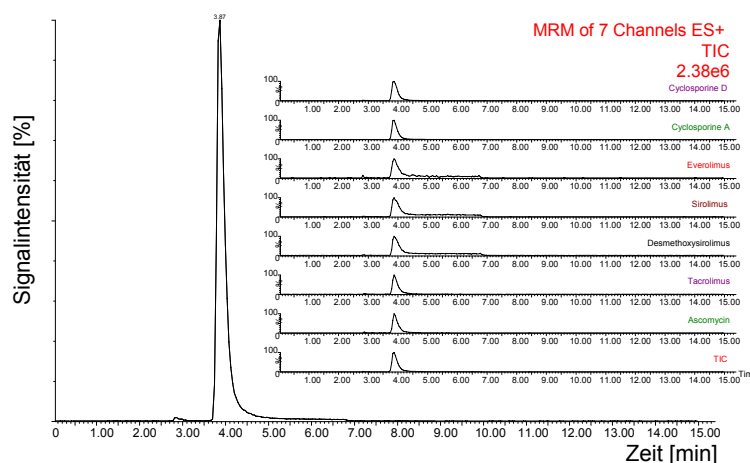


Abbildung 43: Bestimmung des Elutionsvolumens auf der ersten SPE-Kartusche. Probe: Standardlösung der untersuchten Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards; Konzentration 100ng/mL pro Analyt; Injektionsvolumen: 25µL; SPE-Kartusche: LiChrospher® ADS RP4 (10x2mm); mobile Phase: Methanol; Flussrate: 0,5mL/min; MS-Detektion: MRM aller Analyte und der Internen Standards; die Probe wurde zuvor auf derselben Kartusche (10x2mm), fraktioniert (Parameter siehe Anhang 9, Teilschritt 1).

Alle Analyten werden erwartungsgemäß mit Methanol quantitativ desorbiert, weil sie sich gut in Methanol lösen [270].

Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) auf der zweiten SPE-Kartusche

Abbildung 44 zeigt repräsentativ Elutionsprofile einer Standardlösung aller Immunsuppressiva und der Internen Standards (grün dargestellte Chromatogramme) und einer CDB-Matrixprobe (rot dargestellte Chromatogramme) von einer ProntoSil PLR-Kartusche

(10x2mm), gemessen mit einem Massenspektrometer. Gemessen werden dabei gleichzeitig die Massenübergänge aller Analyten und der Internen Standards im MRM-Modus. Die Detektion der Matrix erfolgt über einen für die (Phospho-)Lipide selektiven Massenübergang. Da es sich an dieser Stelle bereits um einen Folgeschritt in der Gesamtanalyse handelt, wurde die Probe bereits dem vollständigen ersten Teilschritt unterzogen. Dazu gehören die Fraktionierung und der Waschschrift auf der LiChrospher® ADS RP4 SPE-Kartusche, der Transfer von dieser Kartusche sowie die Fraktionierung auf der zweiten Kartusche (ProntoSil PLR-Kartusche) (Parameter siehe Anhang 9, Teilschritt 1-5, im Anhang). Der Beginn der Detektion korrespondiert mit dem Start der Elution auf der zweiten Kartusche.

Im oberen Teil von Abbildung 44 erfolgte die übereinanderliegende Darstellung des CDB-Matrixchromatogramms und eines Chromatogramms einer Standardlösung aller untersuchten Immunsuppressiva und der Internen Standards. Zur Elution wurde hier Methanol verwendet. Das Chromatogramm der Analyte (grün) zeigt ein scharfes Signal innerhalb der ersten 0,2 Minuten. Dagegen zeigt das Chromatogramm der Matrix (rot) mehrere, im Vergleich zu den Analyten, sehr große Signale. Dieser Vorgang findet während der ersten 3 Minuten statt. Die Transferzeit der Analyten beträgt 0,2min. Die Berechnung des Elutionsvolumen führt zu 0,2mL.

Im unteren Teil wurden die entsprechenden Chromatogramme mit dem Lösemittel L3 [Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung, pH=2,8 (75/25, v/v)] übereinandergelegt. Hier zeigt das Chromatogramm der Analyte (grün) ein Signal während der ersten zwei Minuten. Das Chromatogramm der Matrix (rot) zeigt dagegen ein Signal zwischen 0,5 bis 1,5 Minuten und ein schwächeres Signal zwischen 3 bis 5 Minuten. Mit dem Lösemittel L3 [Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung, pH=2,8 (75/25, v/v)] beträgt die Transferzeit der Analyte 2 Minuten, das berechnete Elutionsvolumen 1,5 mL.

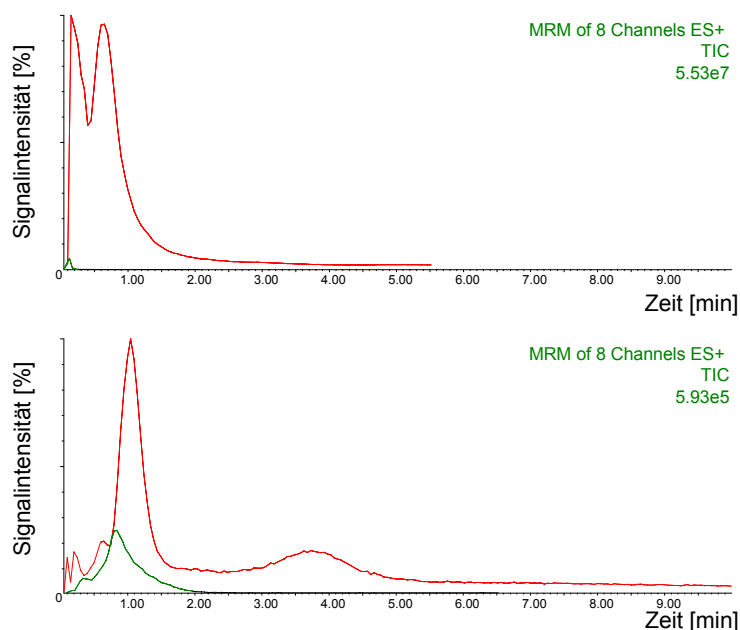


Abbildung 44: Bestimmung des Elutionsvolumens auf der zweiten SPE-Kartusche. Probe (grüne Chromatogramme): Standardlösung der untersuchten Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards; Konzentration 100ng/mL pro Analyt; Matrix (rote Chromatogramme): off-line CDB; Injektionsvolumen: 25µL; SPE-Kartusche: ProntoSil PLR (10x2mm); MS-Detektion (grüne Chromatogramme): MRM aller Analyte und der Internen Standards; MS-Detektion (rote Chromatogramme): MRM aller Analyte und der Internen Standards plus MRM m/z184 ► m/z184; die Probe wurde zuvor auf einer LiChrospher® ADS RP4-Kartusche (10x2mm) und auf derselben Kartusche (10x2mm), fraktioniert (Parameter siehe Anhang 9, Teilschritt 1-5).

(im oberen Teil) mobile Phase: Methanol; Flussrate: 1mL/min.

(im unteren Teil) mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 (75/25, v/v); Flussrate: 0,75mL/min.

Bei Methanol als Lösemittel zur Elution beträgt die Transferzeit der Analyten nur 0,2 Minuten. Die Berechnung des Elutionsvolumens ergibt daher 0,2mL. Dabei werden jedoch sehr viele (Phospho-)Lipide mit transferiert. Mit dem Lösemittel L3 [Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung, pH=2,8 (75/25, v/v)] beträgt die Transferzeit dagegen 2 Minuten. Beim Vergleich der Signalthöhen der Matrixchromatogramme wird jedoch deutlich, dass hier viel weniger (Phospho-)Lipide mit transferiert werden. Das berechnete Elutionsvolumen beträgt jedoch 1mL.

In der Chromatographie sind scharfe Peaks mit entsprechender Signalthöhe von Vorteil. Die Fläche unter dem Peak entspricht der Menge der detektierten Substanz in der Probe. Durch

Signalhöhen- und Flächenquotienten wird das Mengenverhältnis von Analyt zu Matrix verdeutlicht.

Die Signalhöhen und –flächen der Chromatogramme aus Abbildung 44 sind in Tabelle 11 zusammengestellt. Der Flächenquotient für die Elution mit reinem Methanol beträgt im Bereich der ersten zwei Minuten 576. Das bedeutet, dass in einer Patientenprobe ca. um den Faktor 576 mehr Matrixsubstanzen als untersuchte Analyte (Immunsuppressiva und Interne Standards) zu erwarten sind. Der Signalhöhenquotient von Matrix und Analyt bei einer Elution mit reinem Methanol liegt bei 23. Durch den großen Signalhöhenunterschied zwischen Matrix und Analyte, sind die Analyte im Vergleich zur Matrix deshalb nur bedingt wahrnehmbar (Abbildung 44 oben).

Nach Optimierung des Lösemittels und der Flussrate liegt der Signalhöhenquotient innerhalb der ersten zwei Minuten von Matrix und Analyt bei einer Elution mit dem Lösemittel L3 [Methanol/10mm Ammoniumformiatlösung, pH=2,8 (75/25, v/v)] nur noch bei 4. Der Flächenquotient des transferierten Anteils liegt nun bei 3 (siehe Abbildung 44 unten).

Tabelle 11: Signalhöhen und –flächen und ihre Quotienten. Berechnet für die Chromatogrammsignale aus Abbildung 44 innerhalb der ersten zwei Minuten.

| | Signalhöhe | | | Signalfläche | | |
|--|------------|------------|-----------------------------|--------------|------------|-----------------------------|
| | Analyt | Matrix | Quotient Matrix / Analyt | Analyt | Matrix | Quotient Matrix / Analyt |
| Elutionslösemittel | | | | | | |
| Methanol | 2.400.000 | 55.300.000 | 23 | 64.331 | 37.031.366 | 576 |
| Methanol / 10mmol Ammoniumformiatlösung, pH = 2,8 (75/25, v/v) | 149.000 | 593.000 | 4 | 89.216 | 241.677 | 3 |

Mit dem mit Lösemittel L3 [Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung, pH=2,8 (75/25, v/v)] transferierten Volumen an Matrix und Analyt ergeben sich verbesserte Signalhöhen und Flächenquotienten. Der Signalhöhenquotient wurde um den Faktor 6 zugunsten der Analyte versetzt, während der Flächenquotient um den Faktor 192 zugunsten der Analyte verbessert wurde. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle der starke Abreinigungseffekt für die (Phospho-)-Lipidmatrix, welcher mit diesem Lösemittel erreicht wird.

Die Effizienz der (Phospho-)Lipidabreicherung kann durch den Vergleich ihrer Signalflächen allein in den oben ermittelten Transfervolumina berechnet werden. Für die Elution mit reinem Methanol ergibt sich für die (Phospho-)Lipide eine Fläche von 8.853.915 Einheiten im

Transfervolumen von 0,2mL. Für die Elution mit dem Lösemittel L3 [Methanol/10mm Ammoniumformiatlösung, pH=2,8 (75/25, v/v)] ergibt sich eine Fläche von 1.148.576 Einheiten im Elutionsvolumen von 1,5mL. Die Abreicherungs-effizienz der (Phospho-)Lipide beträgt damit ca. 90%.

Dieser Versuch bestätigt, dass die Analyse von Arzneistoffen aus Vollblut nicht nur durch makromolekulare Matrixbestandteile wie Proteine gestört wird, sondern auch durch niedermolekulare Matrixbestandteile wie (Phospho-)Lipide. Sie befinden sich in großen Mengen im Plasma. Außerdem können sie bei der in-line Prozessierung aus Zellmembranen freigesetzt werden. Phospholipide werden als Hauptursache für Matrixeffekte bei der Analyse von biologischen Flüssigkeiten verantwortlich gemacht [135, 141].

Bestimmung des Elutionsvolumens (V_E) auf der dritten SPE-Kartusche

In der Abbildung 45 ist das Elutionsprofil aller untersuchten Analyte und der Internen Standards auf der dritten SPE-Kartusche dargestellt. Die injizierte Probe durchlief vorher bereits die ersten sieben Teilschritte der Analyse (Parameter siehe Anhang). Bei der dritten SPE-Kartusche handelt es sich um eine Oasis[®] MCX-Kartusche (10x2mm). Die Detektion erfolgt auch hier massenspektrometrisch.

Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass das Signal nach 3,7 Minuten beginnt und nach 4,5 Minuten endet. Der Start der Detektion wurde bewusst weit vor dem erwarteten Signalbeginn programmiert, um eine vollständige Signalaufnahme zu gewährleisten. Die Differenz aus Signalstart und –ende beträgt 0,8 Minuten. Dabei handelt es sich um die Transfer- bzw. Elutionszeit. Aus dieser Zeit ist das Elutionsvolumen zu berechnen. Es beträgt 0,8mL. Aus der Programmierung der Analyse ergibt sich ein Startpunkt der Elution bei 3,5 Minuten. Das Totale Ionenchromatogramm (TIC) kann, wie die Abbildung zeigt, in die einzelnen Massenübergänge aufgegliedert werden. Deutlich zu erkennen ist die Elution jedes Analyten und der Internen Standards.

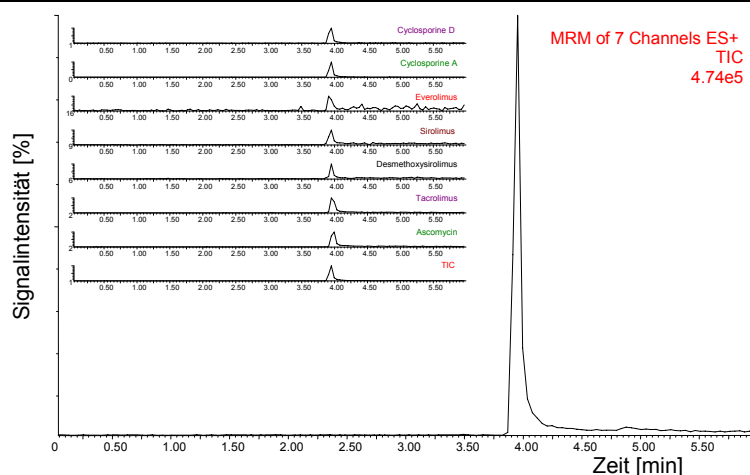


Abbildung 45: Ergebnis der Bestimmung des Elutionsvolumens auf der dritten SPE-Kartusche. Probe: Standardlösung der untersuchten Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards; Konzentration 100ng/mL pro Analyt; Injektionsvolumen: 25µL; SPE-Kartusche: Oasis[®] MCX, 10x1mm; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung mit pH=2,8 (80/20, v/v); Flussrate: 0,1mL/min; MS-Detektion: MRM aller Analyte und der Internen Standards; die Probe wurde zuvor auf einer LiChrospher[®] ADS RP4-Kartusche (10x2mm), auf einer ProntoSil PLR-Kartusche (10x2mm) und auf derselben Kartusche (10x2mm), fraktioniert und gewaschen (Parameter siehe Anhang 9, Teilschritte 1-7).

Auch hier zeigt sich, dass alle Analyte erwartungsgemäß mit Methanol quantitativ desorbiert werden, weil sie sich gut in Methanol lösen [270]. In der Tabelle 12 erfolgt die Zusammenfassung aller ermittelten Elutionszeiten und die daraus berechneten Elutionsvolumina.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich Elutionszeiten und Elutionsvolumina. Bestimmung der Elutionszeiten für die untersuchten Immunsuppressiva und der Internen Standards auf den einzelnen SPE-Kartuschen in Abhängigkeit von mobiler Phase und Fluss und die daraus berechneten Elutionsvolumina.

| | mobile Phase | t_E [min] | Fluss [mL/min] | V_E [mL] |
|---|---|-------------|----------------|------------|
| 1. SPE - Kartusche : LiChrospher [®] ADS RP4 | MeOH | 0,8 | 1 | 0,8 |
| 2. SPE - Kartusche : ProntoSil C30 | MeOH | 0,2 | 1 | 0,2 |
| | MeOH / NH ₄ formiat, pH = 2,8 (75/25, v/v) | 2 | 0,75 | 1,5 |
| 3. SPE - Kartusche : Oasis [®] MCX | MeOH / NH ₄ formiat, pH = 2,8 (75/25, v/v) | 2 | 0,5 | 1 |
| | MeOH | 0,8 | 1 | 0,8 |

Die ermittelten Elutionsvolumina auf der ersten und der dritten Kartusche sind gering und eignen sich daher für eine on-line Analyse. Die längere Elution der Analyte und der Internen Standards von der zweiten Kartusche ist durch das verwendete Lösemittel L3 bedingt. Dieses

Lösemittel wird jedoch zur Abtrennung von (Phospho-)Lipiden benötigt und die sich daraus ergebende längere Analysenzeit ist daher notwendig.

3.3.3.3 Bestimmung der Ventilschaltzeiten

Die Ventilschaltzeiten der 6-Wege-Ventile des Symbiosis Pharma™ Systems (siehe 3.2.3) bestimmen den zeitlichen Ablauf der MD-SPE Methode. Sie werden aus den ermittelten Zeiten für t_A , t_M und t_T jeder Kartusche berechnet (Kapitel 2.2.1.3). Bei jeder Schaltzeit wird im Normalfall ein Sicherheitsaufschlag hinzugerechnet, so dass eine quantitative Analyse auch mit interindividuellen Schwankungen der Patientenproben möglich ist. Um die Gesamtanalysenzeit zu beeinflussen, können die Ventilschaltzeiten und die Flussrate eingestellt werden. Für eine Verkürzung der Analysenzeit sind die Ventilschaltzeiten so früh wie möglich bzw. die Flussrate so hoch wie möglich zu wählen. Die Höhe der Flussrate ist mit dem Rückdruck im System abzustimmen.

In Tabelle 13 erfolgt eine Zusammenstellung aller Ventilschaltzeiten für eine MD-SPE Methode für Immunsuppressiva aus CDB. Zu entnehmen sind darüber hinaus die rechnerischen Zusammenhänge, mit denen die Schaltzeiten ermittelt wurden.

Tabelle 13: Ventilschaltzeiten und Berechnungsformeln.

| | Formel | Berechnung | Ventilschaltzeit [min] | Bemerkung |
|---|--|---|---------------------------|--|
| t_{V1} | $t_{V1} = t_{\text{cart, cond, inj, process}} + t_{M(\text{RAM})} + X$ | $t_{V1}[\text{min}] = 4:51 + 1:00 + 4:14$ | 10:05 | <ul style="list-style-type: none"> • Ende der größenselektiven Fraktionierung auf der RAM SPE-Kartusche • Bedingung: $t_{V(\text{RAM})} > t_{M(\text{RAM})}$ ist erfüllt ($>30\text{mL} > 1\text{mL}$) |
| t_{V2} | $t_{V2} = t_{V1} + t_{T(\text{RAM})} + X$ | $t_{V2}[\text{min}] = 10:05 + 1:30 + 2:06$ | 13:41 | <ul style="list-style-type: none"> • Ende des Analyttransfers von der RAM- auf die C30-SPE-Kartusche |
| t_{V3} | $t_{V3} = t_{V2} + t_{M(\text{C30})} + X$ | $t_{V3}[\text{min}] = 13:41 + 0:00 + 0:00$ | 13:41 | <ul style="list-style-type: none"> • Ende der Fraktionierung auf der C30-Kartusche |
| t_{V4} | $t_{V4} = t_{V3} + t_{\text{cart}} + t_{T(\text{C30})} + X$ | $t_{V4}[\text{min}] = 13:41 + 0:32 + 2:00 + 1:30$ | 17:43 | <ul style="list-style-type: none"> • Ende des Transfers der "front-cut"-Fraktion der Analyte von der C30-auf die MCX-Kartusche • Bedingung: $t_{T(\text{Analyt auf C30})} < t_{T(\text{Phospholipid auf C30})}$ ist erfüllt ($2\text{mL} < 20\text{mL}$) |
| t_{V5} | $t_{V5} = t_{V3} + t_{M(\text{MCX})} + X$ | $t_{V5}[\text{min}] = 17:43 + 0:00 + 0:00$ | 17:43 | <ul style="list-style-type: none"> • Ende der Fraktionierung auf der MCX-Kartusche |
| t_{V6} | $t_{V6} = t_{V5} + t_{T(\text{MCX})} + X$ | $t_{V6}[\text{min}] = 17:43 + 2:00 + 0:00$ | 19:43 | <ul style="list-style-type: none"> • Ende des Analyttransfers von der MCX-Kartusche auf die analytische Säule |
| $t_{\text{cart}} = \text{Zeit, die für den Kartuschenwechsel benötigt wird}$ | | | t_{cond} | $t_{\text{cond}} = \text{Zeit, die für die Konditionierung der Kartuschen benötigt wird}$ |
| $t_{\text{inj}} = \text{Zeit, die für die Injektion der Probe benötigt wird}$ | | | t_{process} | $t_{\text{process}} = \text{Zeit, die für die Prozessierung der Probe benötigt wird}$ |

Mit Hilfe der in diesem Kapitel beschriebenen multidimensionalen Festphasenextraktion (MD-SPE) werden in einer CDB-Probe zuerst die makromolekularen Bestandteile durch Größenausschlusschromatographie auf einer LiChrospher[®] ADS RP4 SPE-Kartusche abgetrennt. Während die Analyte noch durch den Umkehrphasenmechanismus extrahiert werden, werden darüber hinaus weitere hydrophilere Fraktionen an (Phospho-)Lipiden aus der Probe gewaschen. Auf dem zweiten SPE-Material (ProntoSil PLR) wird durch selektive Elution der Analyte die Fraktion der hydrophoberen (Phospho-)Lipide abgetrennt. Zuletzt wird die Probe von hydrophilen und anionischen Verbindungen auf der dritten SPE-Kartusche, einem starken Kationenaustauscher, befreit.

Eine ideale Probenaufbereitung ist schnell, akkurat, präzise und benötigt nur wenig Lösemittel. Es gibt definierte Kriterien, mit denen eine hohe Sensitivität bei bioanalytischen Methoden erreicht werden kann. Dafür ist u.a. eine gute Probenaufbereitung essentiell [56, 268]. Sie wird als Schlüsselfaktor einer erfolgreichen Analyse bezeichnet [58]. Andere Anforderungen an eine moderne Extraktionsmethode beinhalten einen hohen Durchsatz und die Kompatibilität mit der weiteren Analysenmethode [273]. Darüber hinaus wirken sich eine leichte Handhabung und niedrige Materialkosten günstig aus. Viele dieser Ziele können durch eine Automatisierung aller analytischen Schritte von der Probenaufbereitung über den Trennungs- bis hin zum Detektionsschritt erfüllt werden [274]. Für die Quantifizierung der Analyte mit einer on-line Probenaufbereitung ist die Bestimmung der Ventilschaltzeiten von besonderer Bedeutung. In diesem Kapitel wurde die Ermittlung aller notwendigen Kenngrößen für eine automatisierte Aufbereitung von CDB für die Bestimmung von Immunsuppressiva beschrieben. In den folgenden Kapiteln erfolgt die entsprechende Beschreibung für den Trennungs- und den Detektionsschritt.

3.3.4 Ermittlung einer POPLC-Segmentkombination für den analytischen Trennvorgang

Das Ziel einer chromatographischen Untersuchung ist die Trennung der Zielanalyte untereinander zum Zweck ihrer selektiven Bestimmung. Bei einer bioanalytischen chromato-

graphischen Untersuchung ist die zusätzliche Trennung der Analyte von interferierenden Matrixsubstanzen erforderlich. Darüber hinaus können in der Probe weitere Substanzen (z.B. Metabolite) enthalten sein, die zu einer Beeinflussung der Quantifizierungsergebnisse führen. Auch die Internen Standards können durch ihre Ähnlichkeit zu den Analyten zur Verfälschung der Ergebnisse führen.

In diesem Kapitel erfolgt daher die Beschreibung:

- der Trennung der Analyte von den interferierenden Matrixsubstanzen (z.B. Proteine und (Phospho-)Lipide innerhalb der Analyse.
- der Trennung der Analyte von eigenen Interferenzen (Metabolite, Interne Standards, usw.). Dies erfolgt am Beispiel eines Internen Standards, der isobar zu einem Modellanalyten ist.

Innerhalb der Methodenentwicklung für einen vollautomatischen Analyseprozess mittels on-line SPE-LC-MS/MS, hat die Entwicklung des Trennungsschrittes großen Einfluss auf den Erfolg. Eine gewissenhafte Trennung der Interferenzen führt zu einer robusten hochsensitiven LC-MS/MS-Methode.

3.3.4.1 Anforderungen und Ziele an den Trennvorgang

Die Trennung der Modellanalyte ist mit einigen chromatographischen Problemen verbunden. Diese ergeben sich u. a. dadurch, dass zur Detektion ein Tandem-Massenspektrometer verwendet wird. Zur Lösung wurde die sogenannte Phasen-optimierte Flüssigkeitschromatographie, abgekürzt POPLC, verwendet.

Folgende Ziele ergaben sich für den Trennvorgang für Immunsuppressiva aus CDB mit Hilfe einer on-line SPE-POPLC-MS/MS Analyse:

1. ein Ersatz einer Gradientenelution, sowohl für den Aufreinigungsschritt als auch für den Trennungsschritt, durch einen isokratischen Elutionsmodus,
2. eine kurze Gesamtanalysenzeit,
3. ein hoher Anteil an organischem Modifier,
4. eine ausreichende Trennung des Systempeaks vor der Elution des ersten Analyten,
5. eine Flussrate, die mit einem Elektrospray-Ionisation Modus bei der Detektion kompatibel ist,
6. eine „Basislinien“-Trennung von Ciclosporin A von seinem Internen Standard Ciclosporin D,
- 7a. eine ungestörte Analyse, d.h. die Elution der Analyte außerhalb des Zeitfensters der Ionensuppression oder
- 7b. eine ungestörte Analyse, d.h. Elimination aller interferierenden Matrixbestandteilen und Elution der Analyte in einer möglichst kurzen Analysenzeit.

Abbildung 46 zeigt die geforderten Ziele für eine chromatographische Trennung schematisch: Auf der unteren Zeitachse sind Teilschritte eines Analysenzyklusses zu sehen. Nach der Fraktionierung erfolgt der Transfer der Analyte auf die analytische Säule. Dort kommt es zum eigentlichen Trennungsvorgang. Wird ein Gradientenelutionsmodus gewählt, ist eine Reäquilibration der analytischen Säule notwendig. Im mittleren Teil der Abbildung ist ein typisches on-line Chromatogramm dargestellt. Ein Systempeak entsteht aufgrund der Säulenschaltung. Danach kommt es zur Elution der einzelnen Analyte. Die Ziele sind nummeriert und rot umrandet. Der isokratische Elutionsmodus, d.h. gleichbleibende Lösemittelzusammensetzung über den gesamten Analysenzyklus, ist am oberen Rand durch die gerade Linie dargestellt. Das zweite Ziel, eine verkürzte Analysenzeit zu erzielen, ist durch den Wegfall des Reäquilibrationsschritts möglich. Besteht die mobile Phase aus einem hohen Anteil Organik (siehe Balken am linken Rand), wird automatisch auch eine hohe Ionisationsausbeute (siehe Balken am rechten Rand) erzeugt. Die Nummer fünf markiert die Nutzung eines Flusses, der mit der massenspektrometrischen Detektion kompatibel ist. Ein wichtiges Ziel ist die Trennung von Interferenzen wie beispielsweise Interne Standards mit gleichen Massenübergängen wie die der Analyte. Dies ist durch die Nummer sechs gekennzeichnet. Das siebte Ziel wird dadurch hervorgehoben, dass die Elution der Analyte erst nach der Ionensuppression beginnt.

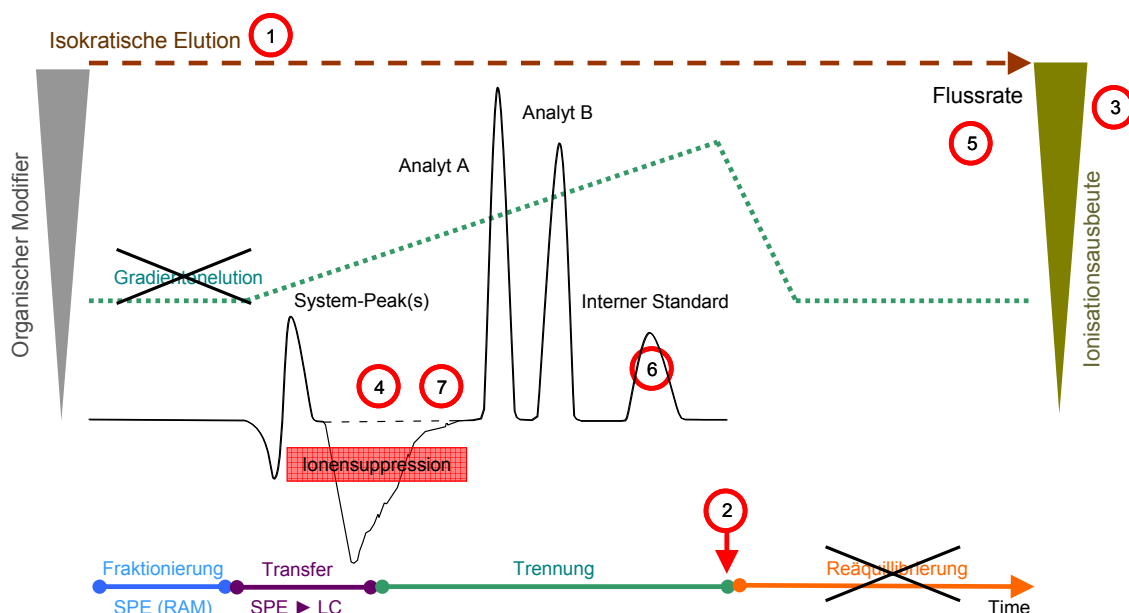


Abbildung 46: Ziele einer POPLC-Trennung: 1. Isokratischer Elutionsmodus, 2. kurze Analysenzeit, 3. mobile Phase, die eine hohe Ionisationsausbeute erzielt, 4. ausreichende Trennung des Systempeaks von der Elution der Zielanalyte (gestrichelte Linie), 5. MS-kompatible Flussrate, 6. Trennung aller Zielanalyte von interferierenden Substanzen, 7a. Elution aller Analyte außerhalb des Zeitfensters der Ionensuppression (durchgezogene Linie) und 7b. Eliminierung aller interferierender Matrixeffekte und Elution der Analyte in einer kurzen Analysenzeit.

Bislang konnte eine Trennung von Immunsuppressiva nur mit Hilfe einer Gradientenelution erreicht werden. Dabei wird im Laufe der Analyse der Anteil an organischem Modifier erhöht, um auch für die zuletzt eluierenden Analyte eine ausreichend gute Peakform zu gewährleisten. Während der Reäquilibration wird dann der Anteil an organischem Modifier wieder auf die Ausgangskonzentration reduziert. Dieses Verfahren ist aufgrund des Reäquilibrationsschrittes sehr zeitaufwendig.

Bei der Analyse von Immunsuppressiva ist bekannt, dass die Trennung von Ciclosporin A und D problematisch ist, denn Ammoniumaddukte von Ciclosporin A-Metaboliten sind teilweise isobar zu Ciclosporin D. Isobar bedeutet, dass sie die gleiche Molekülmasse haben. Sie sind deshalb mit einem Massenspektrometer nicht trennbar. Das Signal für den Massenübergang von Ciclosporin D kann damit auch Metabolite von Ciclosporin A überlagern. Den internen Standard, in diesem Fall Ciclosporin D, der einer Analyse als Korrekturfaktor hinzugefügt wird, ist damit fehlerbehaftet. Werden Ciclosporin A und D jedoch chromatographisch getrennt, werden im besten Fall beim Massenübergang von Ciclosporin D zwei Signale

erhalten. Davon steht eins für die Metabolite von Ciclosporin A zum Zeitpunkt, an dem Ciclosporin A eluiert, und unabhängig davon steht das zweite Signal für Ciclosporin D selbst.

3.3.4.2 Bestimmung der POPLC-Segmentkombination für den Trennvorgang

Kernstück einer on-line SPE-LC-MS/MS Methode ist der analytische Trennvorgang. Als analytische Säule kommt in dieser Arbeit eine POPLC-Segmentkombination zum Einsatz. Die Bestimmung der Zusammensetzung der Segmente erfolgt wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben.

Im ersten Schritt wird die mobile Phase festgelegt, welche eine möglichst hohe Ionisationsausbeute liefert. In diesem Zusammenhang wurde ein Methanol/Wasser-Gemisch mit einem hohen methanolischen Anteil ausgewählt. In einer separaten Versuchsreihe erfolgte die Einstellung des Methanolgehaltes, der den Trennvorgang am besten unterstützt. Dafür mußte für den zuletzt eluierenden Analyten, in diesem Falle Ciclosporin A, ein Retentionsfaktor von fünf auf der stationären Phase ProntoSil 100-5-C18 SH 2 (rot) erreicht werden. Um die Ionisation der Analyte in der Quelle des Massenspektrometers zu begünstigen, wurde der wässrige Anteil der mobilen Phase mit Ammoniumacetat auf einen leicht sauren pH-Wert eingestellt. Darüber hinaus wird eine Verschleppung von potentiellen hydrophoben (Phospho-)Lipiden in den nächsten Analysenzyklus entgegengewirkt. Chambers et al. konnten zeigen, dass eher hydrophobe Dialkylphospholipide in der Umkehrphasenchromatographie bei hohen pH-Werten länger reteniert werden [267]. Ein weiterer positiver Effekt des leicht sauren pH-Wertes ist, dass dadurch schärfere Peaks erzielt werden [1]. Die ermittelte mobile Phase besteht damit aus Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung (80/20, v/v).

Die mit dieser mobilen Phase in Kombination mit den fünf stationären Phasen des POPLC-Kits ermittelten Retentionschromatogramme der einzelnen Analyte zeigt Abbildung 47.

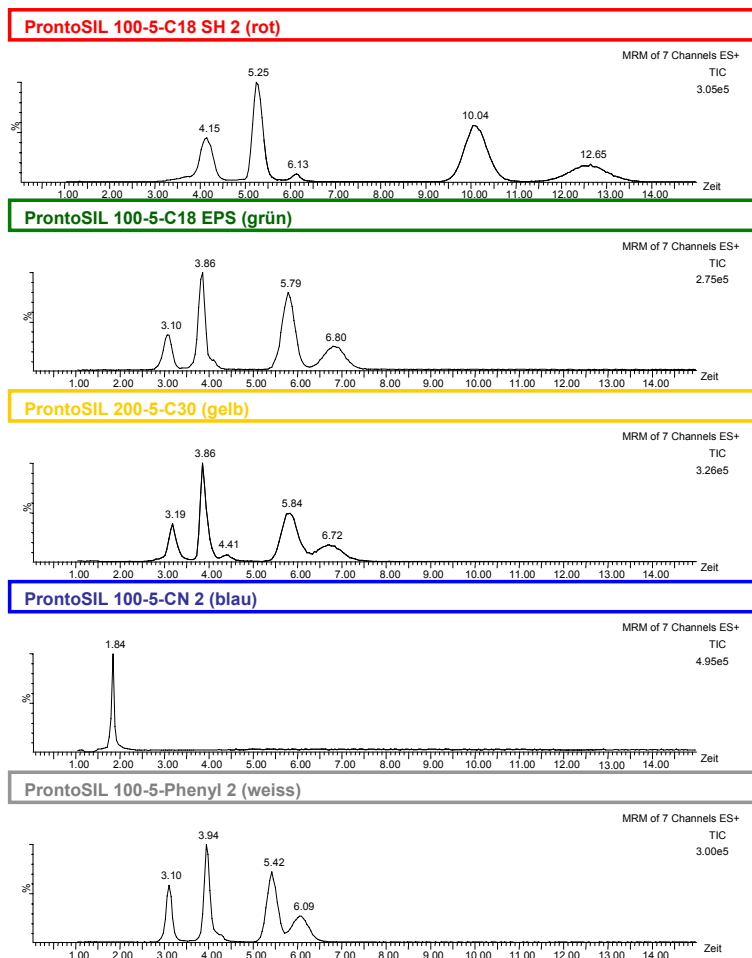


Abbildung 47: Bestimmung der Retentionszeiten für alle Modellanalyte auf den fünf stationären POPLC-Phasen. 100mm ProntoSil 100-5-C18 SH 2 (rot), 100mm ProntoSil 100-5-C18 EPS 2 (grün), 100mm ProntoSil 200-5-C30 (gelb), 100mm ProntoSil 100-5-Cyano 2 (blau) und 100mm ProntoSil 100-5-Phenyl 2 (weiß); mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (80/20, v/v); Flussrate: 0,5mL/min; Injektion: 25µL einer Standardlösung mit 100ng/mL jedes Analyten gelöst in mobiler Phase; Temperatur: 60°C; Detektion: MRM aller Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards.

Auf der stationären Phase ProntoSil 100-5-C18 SH 2 (rot) sind bei 4,15min, bei 5,25min, 6,13min, 10,04min und bei 12,65min fünf Signale zu erkennen. Durch Aufspaltung des hier gezeigten Totalen Ionenchromatogramms (TIC) in die einzelnen Massenübergänge (nicht gezeigt) können die Signale den Analyten zugeordnet werden. Eine erste wichtige Erkenntnis ist, dass mit dieser stationären Phase (rot) Ciclosporin A (10,04min) von Ciclosporin D (12,65min) „Basislinien getrennt“ werden kann. Außerdem erfolgt hier die beste Trennung der Analyte. Nachteilig ist, dass die Analysenzeit mit 15min sehr lang ist. Auf der ProntoSil 100-5-Cyano 2 (blau) ist nur ein einzelnes scharfes Signal bei 1,54min zu sehen. Durch Auftrennung des Totalen Ionenchromatogramms in die einzelnen Massenübergänge (nicht

gezeigt) wird die Elution aller Analyte zum selben Zeitpunkt bestätigt. Demnach können die Modellanalyten auf diesem Material nicht getrennt werden. Die Chromatogramme auf den anderen drei stationären Phasen [ProntoSil 100-5-C18 EPS 2 (grün), ProntoSil 200-5-C30 (gelb) und ProntoSil 100-5-Phenyl 2 (weiß)] sehen sehr ähnlich aus. Dies bestätigt auch die Auftrennung der hier gezeigten Totalen Ionenchromatogramme in die einzelnen Massenübergänge (nicht gezeigt). Die Effekte der verschiedenen Materialien sind hier nicht offensichtlich.

Tabelle 14 zeigt die zusammengestellten ermittelten Retentionswerte der einzelnen Modellanalyte inklusive der Internen Standards:

Tabelle 14: Retentionszeiten aller Modellanalyte und der Internen Standards auf den einzelnen stationären Phasen. 100mm ProntoSil 100-5-C18 SH 2 (rot), 100mm ProntoSil 100-5-C18 EPS 2 (grün), 100mm ProntoSil 200-5-C30 (gelb), 100mm ProntoSil 100-5-Cyano 2 (blau) und 100mm ProntoSil 100-5-Phenyl 2 (weiß) je (100x3mm); mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (80/20, v/v); Flussrate: 0,5mL/min; Injektion: 25µL einer Standardlösung, 100ng/mL jedes Analyten, gelöst in mobiler Phase; Temperatur: 60°C; Detektion: MRM aller Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards.

| | Retentionszeiten | | | | |
|---------------------|------------------|------|------|--------|------|
| | EPS | SH | C30 | Phenyl | CN |
| Cyclosporin A | 10,04 | 6,34 | 5,84 | 5,42 | 1,76 |
| Cyclosporin D | 12,65 | 7,43 | 6,72 | 6,09 | 1,76 |
| Tacrolimus | 4,24 | 3,14 | 3,19 | 3,14 | 1,80 |
| Ascomycin | 4,07 | 3,02 | 3,14 | 3,06 | 1,80 |
| Sirolimus | 4,99 | 3,37 | 3,65 | 3,78 | 1,84 |
| Everolimus | 5,25 | 3,86 | 3,86 | 3,99 | 1,84 |
| Desmethoxysirolimus | 5,37 | 3,90 | 3,86 | 3,90 | 1,80 |

Aus den ermittelten Retentionswerten und den Totzeiten auf den einzelnen stationären Phasen berechnet die POPLINK[®]-Software in wenigen Sekunden eine Segmentkombination, mit der unter den gegebenen Parametern eine optimale oder die beste Trennung aller Zielanalyte möglich ist.

Die Ziele für die in dieser Arbeit beschriebene Analyse der Immunsuppressiva aus CDB sehen aber nicht in erster Linie eine vollständige Trennung aller Analyte vor. Ein erstes wichtiges Teilziel war daher zunächst die semiempirische Ermittlung einer Segmentkombination aus der Liste aller 152.506 Segmentkombinationen, mit der alle oben genannten Ziele erreicht werden konnten. Die entsprechend gewählte Segmentkombination besteht aus 20mm ProntoSil 100-5-

C18 SH 2 + 20mm ProntoSil 200-5-C30 + 30mm ProntoSil 100-5-CN 2 + 10mm ProntoSil 100-5-Phenyl 2.

In Abbildung 48 ist das von der Software berechnete und das experimentell ermittelte Chromatogramm mit der semiempirisch ermittelten Segmentkombination zu sehen. Das experimentell ermittelte Chromatogramm (blau dargestellt) entspricht dem berechneten (rot dargestellt) nahezu. Leichte Abweichungen können dadurch resultieren, dass die Bestimmung der Retentionszeiten entgegen der üblichen Vorgehensweise mit kompletter Probenaufbereitung erfolgte.

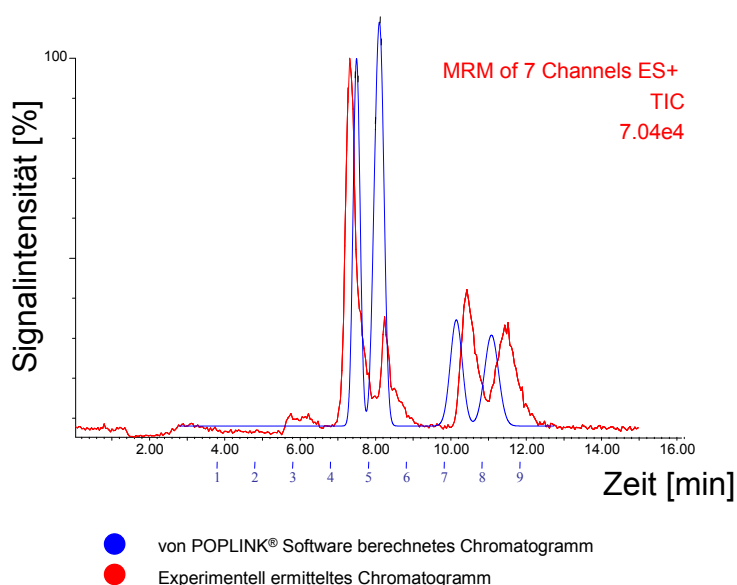


Abbildung 48: Überlagerung des berechneten mit dem experimentell ermittelten Chromatogramm für eine POPLC-Säule. Kombination: 20mm ProntoSil 100-5-C18 SH 2 + 20mm ProntoSil 200-5-C30 + 30mm ProntoSil 100-5-CN 2 + 10mm ProntoSil 100-5-Phenyl 2; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (80/20, v/v); Flussrate: 0,5mL/min; Injektion: 25µL eines Standardlösungsgemisches mit 100ng/mL jedes Analyten gelöst in mobiler Phase; Temperatur: 60°C; Detektion: MRM aller Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards.

Bisher mussten in der konventionellen LC-Methodenentwicklung eine Vielzahl von Parametern und Faktoren vor und während der eigentlichen Methodenentwicklung betrachtet werden. Dieser Prozess war arbeits-, sowie zeitaufwendig und kostenintensiv. Dazu gehörten die Auswahl des Packungsmaterials der analytischen Säule, die zu verwendenden Lösemittel, die Einstellung des pH-Wertes, der Zusatz von organischem Modifier und der Elutionsmodus. Außerdem konnten noch vor 10 Jahren nur wenige Analyte aufgrund von schlechter „Peak-Peak“ Kapazität unter isokratischen Bedingungen mit Hilfe einer on-line Säulenschaltung

analysiert werden [82]. Dies galt damals als größter Nachteil dieser effizienten Methode. Bei einer POPLC-Trennung wird die stationäre Phase modifiziert bzw. optimiert. Dies bietet gegenüber einer konventionellen LC-Methodenentwicklung zahlreiche Vorteile.

3.3.4.3 Überprüfung und zeitliche Ermittlung des Auftretens von Matrixeffekten bei Messungen mit verschiedenen POPLC-Segmentskombinationen

Um Matrixeffekte und deren zeitliche Lage innerhalb der zusammengestellten und oben beschriebenen on-line MD-SPE-POPLC-MS/MS Analyse (im Triple-Kartuschen Modus) für Immunsuppressiva aus CDB zu ermitteln, erfolgte die Aufnahme von Infusionschromatogrammen wie in Kapitel 2.3.5.3 beschrieben. Verwendet wurden dafür zwei verschiedene POPLC-Segmentskombinationen. Die Ermittlung erfolgte zum einen mit der im vorigen Kapitel bestimmten Segmentskombination (Kombination I), bestehend aus 20mm ProntoSil 100-5-C18 SH 2 + 20mm ProntoSil 200-5-C30 + 30mm ProntoSil 100-5-CN 2 + 10mm ProntoSil 100-5-Phenyl 2. Aus der Liste der möglichen Segmentskombinationen (152.506) wurde darüber hinaus eine weitere Segmentskombination (Kombination II) gewählt. Sie besteht aus ProntoSil C30 (200x3mm) + ProntoSil CN 2 (90x3mm). Mit dieser soll gezeigt werden, dass die Elution der Analyte mit Hilfe dieser Segmentskombination verschoben werden kann.

Abbildung 49 zeigt den Einfluss der Segmentskombinationen auf die Injektions- (rot) und Infusionschromatogramme (grün). In Abbildung 49 oben zeigt das Injektionschromatogramm vier Signale zwischen 7min und 12min. Die Elution der Analyte erfolgt in diesem Zeitraum. Aus der Aufspaltung des hier nicht gezeigten Totalen Ionenchromatogramms in die einzelnen Massenübergänge können die beiden Signale zwischen 10min und 11min Ciclosporin A und D zugeordnet werden. Aus den gegebenen Bedingungen ist abzuleiten, dass Ciclosporin A von seinem Internen Standard Ciclosporin D vollständig getrennt werden konnte. Diese Segmentskombination erlaubt die Elution aller Analyte in kurzer Zeit. Das dazugehörige Infusionschromatogramm (grün) zeigt zu Beginn (bis 1min) des Chromatogramms eine gerade Basislinie. Nach dem Injektionspeak (bei ca. 1,5min) fällt die Basislinie für sechs Minuten ab (2min-7min). Nach 8min erreicht das Chromatogramm wieder die Intensität der Basislinie.

Abbildung 49 unten zeigt vier Signale zwischen 12min und 28min. Auch hier können die Signale den einzelnen Analyten durch Aufspaltung des Totalen Ionenchromatogramms in die einzelnen Massenübergänge zugeordnet werden (nicht gezeigt). Aus der Zuordnung folgt, dass die Elutionsreihenfolge identisch ist mit der, die auf der oben vorgestellten Segmentkombination erzielt werden konnte. Das dazugehörige Infusionschromatogramm zeigt bis 23 Minuten eine stabile Basislinie. Allerdings fällt sie zwischen 23 und 26 Minuten ab. Danach erreicht sie wieder ihr ursprüngliches Niveau.

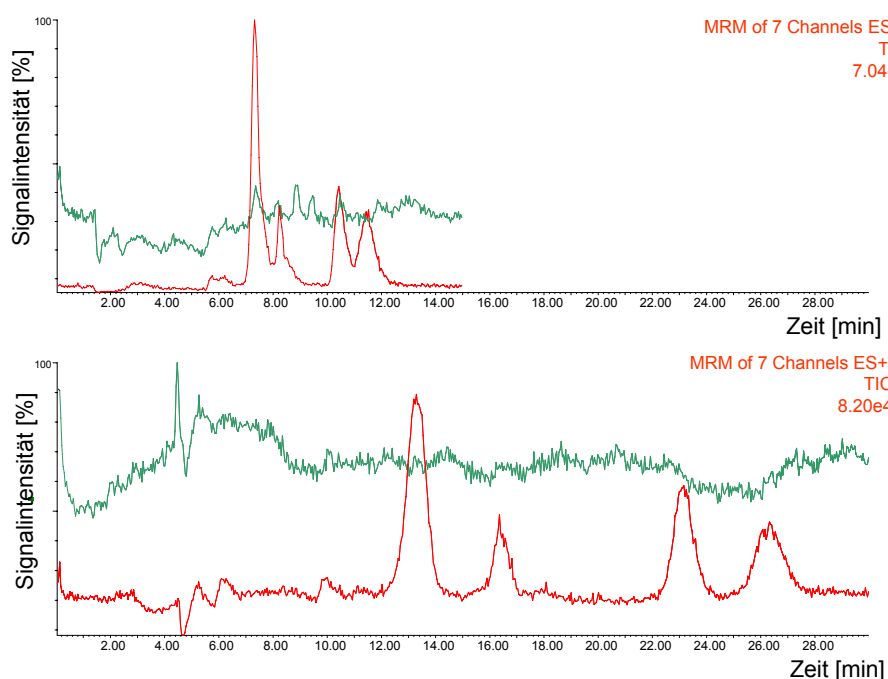


Abbildung 49: Zeitliche Ermittlung von Matrixeffekten: Überlagerung von Injektions-(rot) und Infusionschromatogrammen (grün).

Injektion: 25µL einer Standardlösung mit 100ng/mL jedes Analyten, gelöst in mobiler Phase; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (80/20, v/v); Flussrate: 0,5mL/min; Temperatur: 60°C; Detektion: MRM aller Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards.

Infusion: Standardlösung mit 100ng/mL jedes Analyten, gelöst in mobiler Phase; Flussrate: 10µL/min, Injektion: 25µL CDB.

(im oberen Teil) POPLC-Segmentkombination ProntoSil 18SH 2 (20x3mm) + ProntoSil C30 (20x3mm) + ProntoSil CN 2 (30x3mm) + ProntoSil Phenyl 2 (10x3mm).

(im unteren Teil) POPLC-Segmentkombination ProntoSil C30 (200x3mm) + ProntoSil CN 2 (90x3mm).

Durch die kontinuierliche Infusion einer Standardlösung, die alle untersuchten Immunsuppressiva enthält, entsteht eine gleichmäßige Basislinie erhöhter Intensität. Nach Injektion

einer reinen Matrixprobe (CDB) kommt es auf der Segmentkombination I zu einem Matrixbedingten Abfall der Basislinie (Ionensuppression) (2min-8min). Nach kompletter Elution interferierender Matrixsubstanzen erreicht die Basislinie wieder ihre Grundintensität. Aus der Überlagerung des Injektions- mit dem Infusionschromatogramm kann entnommen werden, dass die Elution der Analyte zu einem Zeitpunkt erfolgt, bei dem die Basislinie des Infusionschromatogramms noch durch die Ionensuppression erniedrigt ist.

Mit der Segmentkombination II wird ein weiteres Teilziel erreicht. Diese Kombination ermöglicht eine Elution der Analyte außerhalb der Ionensuppression (zwischen 2-8 Minuten) der Segmentkombination I (Abbildung 49 oben). Darüber hinaus ist die problematische Trennung von Ciclosporin A und D auf dieser Segmentkombination besser. Bei dem Infusionschromatogramm der Segmentkombination II tritt jedoch eine zusätzliche Ionensuppression (zwischen 23-26min) auf. Ein weiterer großer Nachteil ist die lange Analysenzeit. Mit 28 Minuten ist die Gesamtanalysenzeit mehr als doppelt so lang wie auf der Segmentkombination I.

Mit Hilfe der POPLC konnten innerhalb kurzer Zeit Segmentkombinationen ermittelt werden, mit denen das Erreichen aller 7 Ziele möglich war. Im Jahre 2004 beschrieben Hatsis et al. bereits, dass eine C18-Umkehrphase allein Ciclosporin A, Tacrolimus und Sirolimus nicht ohne Gradienten trennen kann. Dagegen soll dies eine Cyanophase ermöglichen. Eine Trennung von Tacrolimus von seinem Internen Standard sei allerdings nicht möglich [275]. In dieser Arbeit wurde nicht mit Gradientenelution gearbeitet. Hatsis et al. deuteten jedoch darauf hin, dass die verwendeten Analyten nicht auf einem einzelnen Säulenmaterial getrennt werden können. Weiterhin empfahlen sie die Nutzung von polarerem Säulenmaterial. Ohne POPLC-Kit hätten diese Probleme nur durch aufwendiges Austesten verschiedener Trennsäulen gelöst werden können. Für die Umkehrphasenchromatographie stehen zur Zeit ca. 800 verschiedene analytische Säulen zur Verfügung [276]. Wie in Abbildung 49 gezeigt, ist es mit Hilfe der POPLC sogar möglich, die Analyte in einem vorgegebenen Zeitfenster zu eluieren.

Die mobile Phase wurde bei den oben aufgeführten Versuchen dem Detektor angepasst. Der überwiegende Teil der publizierten Methoden nutzt eine mobile Phase mit mindestens 90% an Methanol [233, 263, 277-278]. Obwohl diese Methoden nicht auf Selektivität optimiert worden sind, fiel die Wahl auf eine mobile Phase mit einem hohen methanolischen Anteil. Für eine ausreichend gute Retention der Modellanalyte auf der stationären Phase wurde der methanolische Anteil auf höchstens 80% limitiert. Damit ist eine isokratische Elution der sehr

lipophilen Zielanalyte möglich. Cech et al. berichteten in diesem Zusammenhang, dass ein organischer Anteil über 80% in einigen Fällen sogar zu verringerten ESI-Signalen führt [279].

Für die Trennung der Analyte wurde eine Säulentemperatur von 60°C gewählt. Christians et al. berichten von Peakverbreiterung aufgrund von partieller Trennung von Konformeren einiger Immunsuppressiva [1, 237]. Sowohl Ciclosporin als auch Tacrolimus [280-282] tautomerisieren bei Raumtemperatur. Darüber hinaus führt eine erhöhte Temperatur zu schärferen Peaks.

Das Verfahren der POPLC bietet noch weitere Vorteile für eine LC-MS/MS Methode. So ist es mit Hilfe der POPLC erstmalig möglich, eine für die massenspektrometrische Detektion optimal geeignete mobile Phase auszuwählen und damit einen isokratischen Elutionsmodus zu wählen. Damit fällt der Reäquilibrationsschritt einer Gradientenelution weg und es resultiert eine verkürzte Analysenzeit. Ein isokratischer Elutionsmodus bedeutet weiterhin einen geringeren apparativen Aufwand. Ein großer Vorteil für die Massenspektrometrie ist das daraus resultierende konstante Hintergrundsignal für die Detektion.

Während dieser Untersuchungen ergab sich ein weiteres Ziel für die vorliegende Arbeit. Es galt eine Ionensuppression zu eliminieren, die durch sehr hydrophobe Matrixbestandteile hervorgerufen wird. Da diese Ionensuppression in einem RP-Chromatogramm sehr spät auftritt, könnte es dazu kommen, dass diese Suppression erst im nachfolgenden Chromatogramm auftritt und das Ergebnis verfälscht.

Überlegungen und eine Literaturrecherche ließen vermuten, dass es sich um sehr hydrophobe (Phospho-)Lipide handelt. Im Verlauf der Untersuchungen zur Abreicherung von hydrophilen (Phospho-)Lipiden stellte sich heraus, dass das ProntoSil PLR-Material (Phospho-)Lipide stärker bindet als das hydrophobste Immunsuppressivum, Ciclosporin D. Dieses Prinzip wurde daher als Teilaufreinigungsschritt in die Probenaufbereitung über die MD-SPE Plattform eingebaut (siehe Kapitel 3.3.3). Damit wird schon im Zuge der Aufbereitung einer CDB-Probe eine Ionensuppression durch hydrophobe (Phospho-)Lipide ausgeschlossen.

3.3.5 Optimierung der „Tuning“-Parameter zur spezifischen Steigerung der Ionisationsausbeute der Analyte

Um für die Modellanalyten bei der Detektion eine erhöhte Ionisations- und Fragmentationseffizienz zu erhalten, ist vor den Messvorgängen einmalig eine Massenkalisierung des Massenspektrometers durchzuführen. Dies erfolgte wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben.

Aufgrund des schonenden Ionisationsverfahrens und der höchsten Sensitivität für die Immunsuppressiva fiel hier die Wahl auf den ESI positiven Ionisationsmodus. Mit diesem Modus erfolgte der Aufbau einer MRM-Methode für alle Modellanalyte inklusive der Internen Standards. Zur Anwendung kam dieselbe mobile Phase, die schon zur Bestimmung der Retentionszeiten auf den stationären POPLC-Phasen im Einsatz war [Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (80/20, v/v) (siehe Kapitel 3.3.4.2)]. Die Flussrate betrug dabei 500µL/min. Bei allen Untersuchungen der Analyte betrug die Signalauflösung 1 Dalton, bei Ciclosporin A und D 0,7 Dalton.

Für das „Tuning“ wurde jeder Analyt in einer Konzentration von 100ng/mL in Methanol gelöst. Im Anschluss daran erfolgte die Infusion der jeweiligen Lösungen mit Hilfe der Spritzenpumpe des Massenspektrometers bei einem Fluss von 10µL/min. Als erstes erfolgte die Bestimmung der Ausgangsionen bzw. –addukte der Analyten. Danach wurde die infundierte Lösung dem Eluat aus der HPLC-Analyse über ein T-Stück zugeleitet und das resultierende Signal mit dem Detektor aufgezeichnet. Auf diese Weise erfolgten die Optimierungen aller weiteren Parameter und die der Massenübergänge.

Das Ziel einer massenspektrometrischen Methode ist eine gemeinsame MRM-Methode für alle vier Modellanalyten und ihrer drei Internen Standards. In einer gemeinsamen Methode können nur Cone- und Kollisionsenergie für jeden Analyten einzeln definiert werden. Daher wurde mit dem am schwierigsten zu ionisierenden Analyten Sirolimus gestartet. Für diese Substanz erfolgte die komplette Parametereinstellung. Für alle anderen Analyte und Internen Standards erfolgte im Anschluss daran nur die Bestimmung der beiden individuell bestimmbaren Parameter. Bei diesen Analyten wurden dann die Kapillarspannung, die Quelltemperatur, die Desolvationstemperatur, die HM/LM-Auflösungen, die Eingangs-, die Ausgangs- und die Ionenspannung von Sirolimus übernommen.

Die ermittelten Tunigparameter sind in Tabelle 15 und Tabelle 16 zusammengestellt.

Tabelle 15: Allgemeine „Tuning“-Parameter für eine Parallelbestimmung der Immunsuppressiva und der Internen Standards. Detektor: Waters Quattro Micro; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (80/20, v/v), Flussrate: 0,5mL/min.

| Quelle (ESI ⁺) | | Analyser | |
|-------------------------------|----------|-----------------------|----------|
| Kapillare [kV] | 3,5 | LM 1 Auflösung | 11,5 |
| Cone [V] | variabel | HM 1 Auflösung | 11,5 |
| Quellentemperatur [°C] | 120 | Ionenenergie 1 [V] | 2,5 |
| Desolvatationstemperatur [°C] | 220 | Eingang | -1 |
| Cone Gasfluss [L/h] | 40 | Kollisionsenergie [V] | variabel |
| Desolvatationsgasfluss [L/h] | 600 | Ausgang | 1 |
| | | LM 2 Resolution | 14,0 |
| | | HM 2 Resolution | 14,0 |
| | | Ionenenergie 2 [V] | 1,2 |

Tabelle 16: Variable „Tuning“-Parameter für eine Parallelbestimmung der Immunsuppressiva und der Internen Standards. Detektor: Waters Quattro Micro; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (80/20, v/v), Flussrate: 0,5mL/min.

| | m/z Mutter | m/z Tochter | Cone [V] | Kollision [V] |
|--------------------|------------|-------------|----------|---------------|
| Tacrolimus | 821,2 | 768,3 | 28 | 10 |
| Ascomycin | 809,5 | 756,4 | 25 | 20 |
| Sirolimus | 931,8 | 865,8 | 16 | 24 |
| Everolimus | 975,5 | 908,6 | 15 | 19 |
| Desmethoxyirolimus | 901,8 | 834,7 | 17 | 16 |
| Ciclosporin A | 1219,9 | 1203,0 | 19 | 20 |
| Ciclosporin D | 1233,8 | 1217,6 | 20 | 23 |

LC-MS/MS ist die analytische Methode der Wahl, wenn es um die Bestimmung und Quantifizierung von Arzneistoffen und deren Metabolite aus biologischen Flüssigkeiten und Geweben geht. Dazu müssen folgende Parameter des Massenspektrometers bestimmt werden: Ionisationsmodus, MRM-Übergangionen (Mutterionen), Kapillarspannung, Conespannung, Desolvatationsgasfluss, Quelltemperatur und Kollisionsenergie [135].

Die Bestimmung der „Tuning“-Parameter erfolgte mit einer für das Massenspektrometer geeigneten Flussrate von 0,5mL/min. Die Wahl der Flussrate muss dazu mit dem Massenspektrometer kompatibel sein. Darüber hinaus war die endgültige Methode aber auch zeitlich zu optimieren. Für eine zeitliche Optimierung bei Serien- und Wiederholungsmessungen ist zu empfehlen, die Auswirkungen des Einflusses einer höheren Flussrate weiter zu untersuchen. Es ist davon auszugehen, dass die Signalintensitäten bei einem höheren Fluss geringer werden. Die Massenkalisierung wäre in diesem Fall zu wiederholen. Alternativ

könnte der Fluss ins Massenspektrometer „gesplittet“ werden. Dies führt jedoch bei einer Validierung zu höheren Detektions- bzw. Quantifizierungsgrenzen.

Ionisations- und Fragmentationseffizienz sind die zwei MS-Parameter, die die Detektion oder das Quantifizierungslimit für einen Analyten bestimmen. Um ein stabiles ESI-Spray zu erhalten, müssen die Flussrate, die angelegte Spannung, die Leitfähigkeit und die Oberflächenspannung der mobilen Phase aufeinander abgestimmt werden [279]. Bei ESI hat die mobile Phase bedeutenden Einfluss [149]. Weiterhin ist beim „Tuning“ darauf zu achten, dass sich unter den untersuchten Analyten sehr temperaturlabile Substanzen befinden. ESI ist zwar als schonendstes Ionisationsverfahren bekannt, dennoch wurden die Quell- und die Desolvatationstemperatur möglichst niedrig gehalten. Die Substanz 32-Desmethoxyirolimus neigt schon bei Raumtemperatur zu leichtem Zerfall.

3.3.6 Zusammenstellung der Analysenmethode

Nach der Ermittlung der erforderlichen Parameter für alle SPE-Kartuschen, den Berechnungen der Ventilschaltzeiten, der Optimierung des Trennvorganges sowie des „Tunings“ des Massenspektrometers, wurde der Analysenzyklus zusammengestellt. Der Analysenzyklus für die Bestimmung von Immunsuppressiva in antikoaguliertem Vollblut dauert insgesamt 30 Minuten. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abbildung 50 abgebildet. Die einzelnen Teilschritte des Analysenzyklusses sind farblich gekennzeichnet.

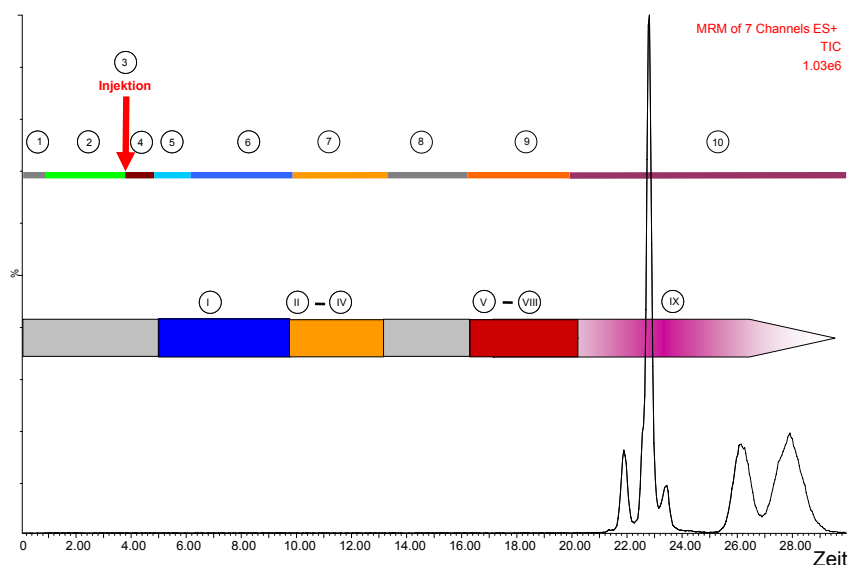


Abbildung 50: Repräsentatives Chromatogramm einer Bestimmung der Immunsuppressiva aus CDB mittels der MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Triple-Kartuschen Modus). Mit römischer Nummerierung sind die Teilschritte des Probenaufreinigungsverfahrens markiert (Details siehe Text); die arabische Nummerierung weist auf verschiedene Vorgänge innerhalb des Analysenzyklus hin: (1) Einsatz von Kartuschen in die Klemmen, (2) Konditionierung der Kartuschen, (3) Injektion, (4) Prozessierung, (5) Fraktionierung auf der 1. Kartusche, (6) Waschen auf der 1. Kartusche, (7) Transfer von der 1. auf die 2. Kartusche und gleichzeitige Fraktionierung auf der 2. Kartusche, (8) Umsetzen der 2. Kartusche und Einsatz von 3. Kartusche in die Klemme, (9) Transfer von der 2. auf 3. Kartusche und gleichzeitige Fraktionierung auf der 3. Kartusche, (10) Transfer von der 3. Kartusche auf die analytische Säule und Trennung.

Das Aufreinigungsverfahren für CDB-Proben setzt sich aus folgenden neun Teilschritten zusammen (siehe Abbildung 51):

- I. Größenselektive Fraktionierung der CDB-Matrix und RP-chromatographische Anreicherung der Zielanalyte auf einer LiChrospher[®] ADS RP4 SPE-Kartusche (10x2mm) (RAM); mobile Phase: Wasser/Acetonitril (95/5, v/v); Fluss: 0,25mL/min für 1 Minute und danach 3mL/min für 1 Minute;
weitere Abreinigung von Matrixbestandteilen mit mobiler Phase: Wasser/Acetonitril (75/25, v/v); Fluss: 3mL/min für 3 Minuten;
- II. Transfer der niedermolekularen (Analyt-)Fraktion von der RAM- auf eine ProntoSil[®] PLR SPE-Kartusche (10x2mm) (molekulare Formerkennung); mobile Phase: Methanol; Fluss: 0,45mL/min für 3 Minuten;

- III. Aufkonzentrierung auf der ProntoSil[®] PLR-SPE-Kartusche (10x2mm) durch in-line Verdünnung; mobile Phase: 10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8; Fluss: 2mL/min für 3 Minuten;
- IV. Formselektive Fraktionierung der niedermolekularen Fraktion auf der ProntoSil[®] PLR-SPE-Kartusche (10x2mm); mobile Phase: Zusammensetzung resultiert aus Teilschritt 2 und 3: Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 (20/80, v/v); Fluss: 2,45mL/min für 3 Minuten;
- V. Selektive Abtrennung der Analytfraktion von der (Phospho-)Lipidfraktion durch „front-cut“ und Transfer auf die Oasis[®] MCX SPE-Kartusche (HLIC und IEC); mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung (75/25, v/v); Fluss: 0,5mL/min für 3 Minuten;
- VI. Aufkonzentrierung der Analytfraktion auf der Oasis[®] MCX SPE-Kartusche (10x1mm) durch in-line Verdünnung; mobile Phase: 10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8; Fluss: 1,5mL/min für 3 Minuten;
- VII. Chemoslektive Fraktionierung der (Analyt-)Fraktion auf der Oasis[®] MCX SPE-Kartusche (10x1mm); mobile Phase: Zusammensetzung resultiert aus Teilschritt 5 und 6: Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 (20/80, v/v); Fluss: 2mL/min für 3 Minuten);
- VIII. Transfer der Zielanalyte von der Oasis[®] MCX SPE-Kartusche (10x1mm) auf die analytische Trennsäule; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (75/25, v/v); Fluss: 0,5mL/min für 2 Minuten;
- IX. Analytische Trennung; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (75/25, v/v); Fluss: 0,5mL/min für 10 Minuten.

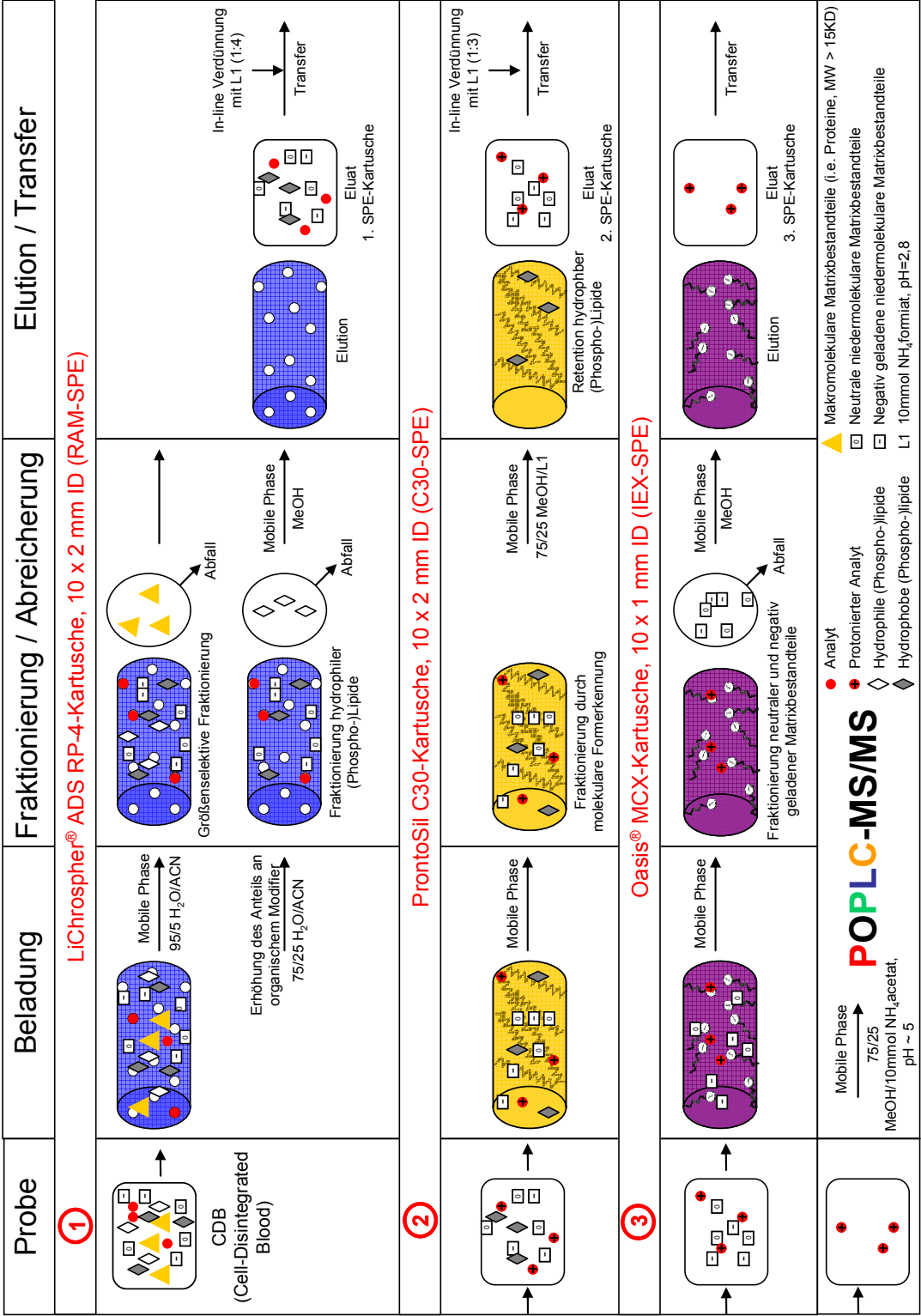


Abbildung 51: Schematische Darstellung des vollständigen Analysenzyklus von CDB.

Für die Analyse der Immunsuppressiva mit Hilfe der MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (im Triple-Kartuschen Modus) aus CDB wurden folgende chromatographischen Medien verwendet:

| | | |
|-------|--|---------------------------------------|
| SPE | RAM: | LiChrospher® ADS RP4 (10x2mm), dp25µm |
| | PLR: | ProntoSil PLR (10x2mm), dp25µm |
| | MCX: | Oasis® MCX (10x1mm), dp30µm |
| POPLC | 20mm ProntoSil C18 SH 2 + 20mm ProntoSil PLR + 30mm ProntoSil CN 2 + 10mm ProntoSil Phenyl 2, 3mm, dp5µm | |

Die multidimensionale Aufreinigung setzt sich damit aus folgenden fünf verschiedenen chromatographischen Trennmechanismen zusammen: Umkehrphasen-, Größenausschluß-, molekulare Formerkennungs-, Hydrophile-Lipophile Interaktions- und Kationenaustausch-Chromatographie. Davon sind vier orthogonal zueinander (siehe auch Tabelle 4).

Die einzelnen Teilschritte wurden mit folgenden Eluenten durchgeführt:

| | |
|-----|---|
| L1 | Wasser/Acetonitril (95/5, v/v) |
| L2 | Wasser/Acetonitril (75/25, v/v) |
| L3 | Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 (80/20, v/v) |
| L3a | Methanol |
| L3b | 10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 |
| L4 | Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 (80/20, v/v) |
| L4a | MeOH/10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 (75/25, v/v) |
| L4b | 10mmol Ammoniumformiatlösung mit pH=2,8 |
| L5 | MeOH/10mmol Ammoniumacetatlösung (75/25, v/v) |

Tabelle 17 gibt Aufschluss über die zeitliche Abfolge der einzelnen Teilschritte eines Analysenzyklus. Aus der Abbildung gehen simultan ablaufende Vorgänge hervor. Weithin sind alle Ventilpositionen aufgeführt.

Tabelle 17: MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Triple-Kartuschen Modus): Zeitliche Abfolge der einzelnen Teilschritte des Analysenzyklus mit Ventilpositionen. Darstellung simultan ablaufender Teilschritte. Der schraffierte Bereich zeigt den Beginn der Aufbereitung einer zweiten Probe während sich die erste Probe noch im Trennungsschritt befindet.

| Zeit | Ventilposition | | | | | | Sonstiges | RAM | C30 | MCX | analytische Säule |
|-------|----------------|-----|-----|-----|-----|------------|---|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| | A | B | C | D | E | F | | | | | |
| 0:00 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Ventilschaltungen Kartuschenaustausch links | | | | Reäquillibrierung Waschen |
| 0:10 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Kartuschenaustausch rechts | | | | Reäquillibrierung Waschen |
| 0:20 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | | Konditionierung | Konditionierung | | Reäquillibrierung Waschen |
| 3:48 | 6-1 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Probenladung | | | | Reäquillibrierung Waschen |
| 3:50 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Injektion Prozessierung | | | | Reäquillibrierung Waschen |
| 4:51 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | | Fraktionierung | | | Reäquillibrierung Waschen |
| 6:11 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | | Waschen | | | Reäquillibrierung Waschen |
| 10:05 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-6 | | | Transfer Fraktionierung | | Reäquillibrierung Waschen |
| 13:41 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Kartuschenaustausch links Kartuschenaustausch rechts | | | | Reäquillibrierung Waschen |
| 14:13 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-6 | | | | Transfer Fraktionierung | Reäquillibrierung Waschen |
| 17:49 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 6-1 | | | | | Transfer analytische Trennung |
| 19:49 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | | | | | Transfer analytische Trennung |
| 19:59 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Ventilschaltungen Kartuschenaustausch links | | | | Transfer analytische Trennung |
| 20:09 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Kartuschenaustausch rechts | | | | Transfer analytische Trennung |
| 23:37 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | | Konditionierung | Konditionierung | | Transfer analytische Trennung |
| 23:39 | 6-1 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Probenladung | | | | Transfer analytische Trennung |
| 24:40 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Injektion Prozessierung | | | | Transfer analytische Trennung |
| 26:01 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | | Fraktionierung | | | Transfer analytische Trennung |
| 29:55 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | | Waschen | | | Transfer analytische Trennung |
| 30:00 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | 1-2 | Ende | | | | Transfer analytische Trennung |

Folgende Schritte werden vor der Analyse durchgeführt: als erstes erfolgt die simultane Konditionierung bzw. Solvatisierung der ersten beiden Kartuschen (LiChrospher[®] ADS RP4 in der linken Klemme und ProntoSil[®] PLR in der rechten Klemme). Dadurch werden die Materialien benetzt und eventuell anhaftende Verunreinigungen in den Abfall gespült. Im Anschluss daran werden die Kartuschen mit der jeweiligen mobilen Phase für die Beladung äquillibriert.

Eine aufgemischte Vollblutprobe wird über die Injektionseinheit in das Analysengerät dosiert. Mit dem Eluenten L1 [Wasser/Acetonitril (95/5, v/v)] wird die luftsegmentierte Probe aus der Probenschleife in die beheizte Edelstahlkapillare überführt, prozessiert und auf der ersten SPE-Kartusche [LiChrospher[®] ADS RP4] fraktioniert.

Für die in-line Prozessierung muss die Flussrate je nach Probenzusammensetzung angepasst werden (siehe Kapitel 3.3.2). (Für eine Probenzusammensetzung Vollblut/DMSO (97,5/2,5, v/v) beträgt die Flussrate 0,27mL/min).

Für den Fraktionierungsschritt wird die Flussrate der mobilen Phase auf 3mL/min für eine Minute erhöht. Da nur 1mL an mobiler Phase benötigt wird um die CDB-Probe auf die Kartusche zu transferieren, werden 2,25mL dafür genutzt, hochmolekulare Matrixbestandteile abzutrennen. Hochmolekulare Matrixbestandteile wie beispielsweise Proteine können durch den Größenausschlußmechanismus nicht in das Poreninnere gelangen und werden daher in den Abfall gespült. Kleinere Moleküle wie die Analyte können ins Poreninnere diffundieren und dort durch den Umkehrphasenmechanismus extrahiert werden. Um bereits im ersten Fraktionierungsschritt weitere hydrophobe Matrixbestandteile aus der Probe zu entfernen, wird die Kartusche mit dem Lösemittel L2 [Wasser/Acetonitril (75/25, v/v)], welches einen höheren Anteil an organischem Modifier besitzt, wiederholt bei einer Flussrate von 3mL/min für drei Minuten fraktioniert bzw. gewaschen.

Nach vollständiger Fraktionierung auf der ersten SPE-Kartusche wird diese mit der zweiten Kartusche in Reihe geschaltet. Dafür wird Schaltventil E geschaltet und die Restprobe (die niedermolekulare Fraktion mit den Analyten) auf die zweite Kartusche [ProntoSil PLR] transferiert und dort extrahiert. Der Eluent L3a [Methanol], der zur Elution von der ersten Kartusche verwendet wird, besitzt eine so hohe Elutionskraft, dass weder die Analyte noch die (Phospho)-Lipide auf der ProntoSil PLR-Kartusche reteniert werden können. Die Restprobe muß daher am Anfang der zweiten Kartusche aufkonzentriert werden. Der Eluent L3a wird daher in-line verdünnt. Dazu wird ein Lösemittel mit geringerer Elutionskraft hinzugemischt. Damit die Analyte für die Retention auf der dritten Kartusche [Oasis[®] MCX] schon ionisiert vorliegen, wurde hier mit demselben Lösemittel gearbeitet, welches dort zur Extraktion verwendet wird. Dabei handelt es sich um das Lösemittel L3b [10mmol Ammoniumformiatlösung mit einem pH-Wert von 2,8]. Der Fraktionierungseluent L3 besteht damit aus Eluent L3a und Eluent L3b [Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit einem pH-Wert von 2,8 (20/80, v/v)]. Es wird mit einer Flussrate von 2,45mL/min für drei Minuten fraktioniert. Die Analyten werden mit 1,35mL reinem Methanol von dem Material der ersten Kartusche desorbiert. Es erfolgt eine in-line Verdünnung mit 6mL einer wässrigen mobilen Phase, um eine Retention auf dem Material der zweiten Kartusche zu garantieren. Da nur 0,5mL reines Methanol für den Transfer benötigt werden, erfolgt die Fraktionierung auf

der zweiten Kartusche folglich mit 6,85mL. Während des Transfers von der ersten Kartusche auf die Zweite, kommt es im Normalfall auf der zweiten Kartusche schon zur weiteren Abreicherung der Restprobe. Da der Elutionspuffer L3 jedoch weniger an organischem Lösemittel enthält als das Fraktionierungslösemittel L2, kommt es bei dieser Fraktionierung zu keiner weiteren Abreicherung.

Die RAM-Kartusche in der linken Klemme wird nach Gebrauch wieder in die Vorratsbox zurückgesetzt. Schaltventil E wird zurückgeschaltet. Die PLR-Kartusche wird nun von der rechten in die linke Klemme umgesetzt. Die dritte Kartusche (Oasis[®] MCX) wird in die rechte Klemme eingesetzt und konditioniert.

Das Schaltventil E wird erneut geschaltet, sodass nun die zweite mit der dritten Kartusche in Reihe geschaltet ist. Die bereits stark abgereicherte Restprobe mit den Analyten wird von der zweiten auf die dritte Kartusche (Oasis[®] MCX) transferiert und dort extrahiert. Die Elution von der zweiten Kartusche (ProntoSil PLR) findet mit dem Lösemittel L4a [Methanol/-10mmol Ammoniumformiatlösung mit einem pH-Wert von 2,8 (75/25, v/v)] statt. Unter diesen Bedingungen wird die (Phospho-)Lipidfraktion auf diesem Material stärker reteniert als die Analyte. Diese Lösemittelzusammensetzung ermöglicht die Elution der Analyte vor der Elution der (Phospho-)Lipidhauptfraktion. Das Elutionsvolumen wird daher exakt so eingestellt, dass es nur zur Elution der Analyte kommt. Durch diesen „front-cut“ verbleibt die (Phospho-)Lipidhauptfraktion auf der Kartusche. (Die Kartusche kann im Anschluss in einem separaten Waschschrift wieder regeneriert werden.) Lösemittel L4a allein besitzt eine so hohe Elutionskraft, dass es auf der dritten Kartusche (Oasis[®] MCX) zu keiner Retention kommt. Daher wird auch hier der in-line Verdünnungsprozess genutzt. Zum Einsatz kommt Lösemittel L4b, das, wie oben erwähnt, Lösemittel L3b [10mmol Ammoniumformiatlösung mit einem pH-Wert von 2,8] entspricht. Fraktionierungseluent L4 besteht damit aus Eluent L4a und Eluent L4b [Methanol/10mmol Ammoniumformiatlösung mit einem pH-Wert von 2,8 (20/80, v/v)]. Die Flussrate beträgt 2mL/min für 3min. Die Desorption der Analyte von dem Material der zweiten Kartusche erfolgt mit dem exakten Transfervolumen von 1,5mL. Das zusätzliche Volumen der in-line Verdünnung wird auf der dritten Kartusche zur Fraktionierung genutzt. Während des Transfers von der zweiten Kartusche auf die Dritte, kommt es somit auf der dritten Kartusche zur Fraktionierung der Probe. Obwohl der Elutionspuffer L4 dieselbe Elutionskraft besitzt wie Elutionspuffer L3, kommt es durch den differenten Retentionsmechanismus auf der dritten Kartusche zu einer weiteren Fraktionierung.

Schaltventil E wird wieder in die Ausgangsposition zurückgeschaltet. Die PLR-Kartusche in der linken Klemme wird zurück in die Vorratsbox gesetzt. Es kann bereits eine weitere RAM-Kartusche in diese Klemme eingesetzt werden und für den nächsten Analysenzyklus konditioniert werden.

Durch Schaltung des Schaltventils F, kommt es zur Elution der dritten Kartusche mit demselben Lösemittel L5 [MeOH/10mmol Ammoniumacetatlösung (75/25, v/v)], welches auch zur Trennung der Analyte auf der analytischen Säule verwendet wird. (Falls dieses Lösemittel so hohe Elutionskraft besitzt, dass es zu keiner scharfen Trennung der Analyte kommt, kann auch hier die in-line Verdünnung (über Schaltventil D) eingesetzt werden.

3.3.7 MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode als allgemeine Plattform für die Analyse weiterer Wirkstoffe

Die in Kapitel 3.3.1 bis 3.3.5 beschriebene Methode wurde speziell für die Analyse von Immunsuppressiva aus CDB entwickelt. Die erstellte MD-SPE-POPLC-MS/MS Plattform ist generisch und sollte sich daher für die Analyse weiterer Arzneimittel eignen. Die Methode beinhaltet zahlreiche Ansatzmöglichkeiten für eine Optimierung bzw. Anpassung an entsprechende Analyte. Nachfolgend wird aufgezeigt und diskutiert, wie weitere Anwendungsmöglichkeiten aussehen könnten.

Größte Stellmöglichkeit ist die Wahl und die Anzahl geeigneter SPE-Materialien. In dieser Arbeit wurden bereits mehrere SPE-Materialien für den ersten Aufreinigungsschritt getestet. Je nach stationärer Phase können die Anzahl an Aufreinigungs- und zueinander orthogonalen Trennmechanismen (Dimensionen) variiert werden. Dies hat wiederum entscheidenden Einfluss auf die Selektivität der Analyse. Für den dritten Aufreinigungsschritt wurden in dieser Arbeit ebenfalls verschiedene Materialien getestet. Für die Analyse stark kationischer oder anionischer Analyte bietet die Firma Waters weitere Materialien aus der Familie der Oasis[®]-Materialien an. Diese entsprechen dem in dieser Arbeit verwendeten Oasis[®] MCX-Material.

Tabelle 18 enthält alle hier untersuchten SPE-Materialien mit ihren chromatographischen Modi nach Giddings [77] und die sich dadurch berechnenden chromatographischen Dimensionen (siehe auch Tabelle 4).

Tabelle 18: Zusammenstellung untersuchter SPE-Materialien. Chromatographischen Modi nach Giddings und den sich dadurch berechnenden chromatographischen Dimensionen [77].

| SPE - Material | chromatographische Modi | chromatographische Dimension(en) |
|----------------------------|--|----------------------------------|
| HySphere C2 | Umkehrphasen - Chromatographie, RPC | 1 |
| HySphere C8 | Umkehrphasen - Chromatographie, RPC | 1 |
| HySphere C8 EC-SE | Umkehrphasen - Chromatographie, RPC | 1 |
| HySphere C18 | Umkehrphasen - Chromatographie, RPC | 1 |
| Oasis® HLB | Hydrophile - Lipophile Interaktionen - Chromatographie, HLIC | 1 - (2) |
| LiChrospher® ADS RP 4 | Größenausschluss - Chromatographie, SEC ¹ | 2 |
| | Größenausschluss - Chromatographie, SEC | |
| | Umkehrphasen - Chromatographie, RPC | |
| ProntoSil C30 | "Molekulare Formerkennung" - Chromatographie, SSC ² | (1) |
| Oasis® MCX | Hydrophile - Lipophile Interaktionen - Chromatographie, HLIC | 2 - (3) |
| | Ionenaustausch - Chromatographie, IEC | |
| | Größenausschluss - Chromatographie, SEC ¹ | |
| Oasis® WCX | Hydrophile - Lipophile Interaktionen - Chromatographie, HLIC | 2 - (3) |
| | Ionenaustausch - Chromatographie, IEC | |
| | Größenausschluss - Chromatographie, SEC ¹ | |
| HySphere Mixed Mode Kation | Hydrophile - Lipophile Interaktionen - Chromatographie, HLIC | 2 |
| | Ionenaustausch - Chromatographie, IEC | |
| Strata NH2 | Hydrophile Interaktionschromatographie | 1 |
| Strata Si-1 Silica | Hydrophile Interaktionschromatographie | 1 |

¹ Größenausschluss - Chromatographie besteht nur bei Flussraten > 3 mL/min

² "Molekulare Formerkennung" ist kein chromatographischer Modus nach Giddings, verhält sich aber wie ein weiterer chromatographischer Modus

Die gleichzeitige Aufreinigung einer Probe über mehrere Dimensionen wird durch die Verwendung von Oasis®-Materialien und von LiChrospher® ADS RP4 erreicht. Ein weiterer großer Vorteil von Oasis®-Materialien ist die Einsparung an Konditionierungs- bzw. Äquilibrationszeit [58].

Eine Optimierung des Fraktionierungsschrittes kann durch ein möglichst großes Volumen zwischen Fraktionierungs- und Durchbruchvolumen erreicht werden. Dabei können der Zusatz eines organischen Modifiers, die Einstellung eines geeigneten pH-Wertes oder eine angemessene Ionenstärke der mobilen Phase förderlich sein [82]. Eine Aufkonzentrierung der Analyte bei der Aufreinigung können sowohl durch „Backflush“ als auch durch in-line Verdünnung bewirkt werden.

Eine weitere Stellmöglichkeit bietet die HPLC. Das in dieser Arbeit genutzte POPLC®-Kit arbeitet mit Materialien unterschiedlicher Retentionsmechanismen. Es unterstützt die generische Plattform dahingehend, dass in kürzester Zeit eine geeignete POPLC-Segmentkombination für die Trennung zahlloser Analytgemische gefunden werden kann. So können auch Interferenzen, die durch den Aufreinigungsschritt nicht abgetrennt werden

konnten, noch chromatographisch in dem nachgeschalteten Trennungsschritt abgetrennt werden. Im Hinblick auf einen begrenzten Rückdruck, den das System erlaubt, sollten die Säulenlänge und die Flussrate nicht unbeachtet bleiben.

Eine erhöhte Temperatur hat mehrere positive Effekte. Es erniedrigt die Viskosität der mobilen Phase, sodass theoretisch eine kleinere Partikelgröße verwendet werden kann. Daraus resultiert eine bessere Säuleneffizienz. Aber auch der Rückdruck wird dabei vermindert. Für lipophile Substanzen bietet eine erhöhte Temperatur einen weiteren Vorteil. Sie erhöht die Diffusion und damit die Adsorption. Eine Temperatur von 60°C bietet darüber hinaus auch Vorteile für die Elution der Phospholipide. Eine niedrigere Temperatur würde diese erst viel später eluieren. Dadurch wird das Risiko, dass sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den nächsten Zyklen eluieren, unkontrollierbar. Bei schwer zu trennenden Analyten kann eine erhöhte Temperatur aber auch von Nachteil sein. Die Retention der Analyte auf der stationären Phase nimmt ab [283].

Eine begrenzte Optimierung bietet das Massenspektrometer. Jedoch können die hier vorgenommenen Einstellungen großen Einfluss auf die Sensitivität der Methode haben. Die Wahl der mobilen Phase, ihre Flussrate in das Massenspektrometer und die Massenkalkulation des Massenspektrometers können hierbei Veränderungen bewirken. Segarra et al. und Wang et al. bevorzugen eine mobile Phase, bestehend aus einem wässrigen Anteil größer 10% und ein pH-Wert <5. So können sehr instabile Substanzen wie beispielsweise Sirolimus vor einem zu schnellen Abbau geschützt werden. Wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit könnte auch Everolimus, besonders aber 32-Desmethoxysirolimus, Degradationsmechanismen unterliegen [262, 284].

Verbesserte Signale im Elektrospray durch einen leicht sauren pH-Wert beschreiben auch Polsen et al. und andere [57, 279]. Sie setzen der mobilen Phase 0,1% Ameisensäure hinzu. In dieser Arbeit unterstützt Ammoniumacetat in der mobilen Phase die Ammoniumadduktbildung in der Quelle.

3.4 Evaluation der entwickelten MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Triple-Kartuschen Modus)

3.4.1 Bestimmung der Robustheit einzelner Untereinheiten der MD-SPE-POPLC-MS/MS Plattform

3.4.1.1 Bestimmung der Robustheit der Prozessierungseinheit

Als anfällige Untereinheit des vollautomatisierten Analysensystems für die Analyse von Vollblutproben wurde die Prozessierungseinheit identifiziert. Die Prozessierung des Vollbluts erfolgt über eine Hitzeschockbehandlung in einer Edelstahlkapillare. Problematisch ist insbesondere die Verstopfung des Systems (Kapillaren, Ventile, Fittings, Siebe, Kartuschen oder Säulen). Beispielsweise kann eine zu lange Hitzeschockbehandlung zur Gelbildung der Vollblutprobe führen. Dies führt unvermeidlich zu Verstopfungen. Für die Hitzeschockbehandlung muss daher die Flussrate präzise berechnet und eingestellt werden. Darüber hinaus sind geeignete Lösemittel auszuwählen. Ein hoher Anteil an organischem Lösemittel, sowohl in der mobilen Phase als auch in eventuell verwendeten Waschlösemitteln, führt zu Präzipitaten, wodurch es ebenfalls zur Verstopfung des Systems kommt. Die Robustheit der Prozessierungseinheit wurde deswegen eingehend geprüft.

Instrumenteller Aufbau

Für die Untersuchungen zur Robustheit der Prozessierungseinheit wurde ein auf die essentiellen Einheiten minimierter instrumenteller Aufbau gewählt. Er ist in Abbildung 52 schematisch dargestellt.

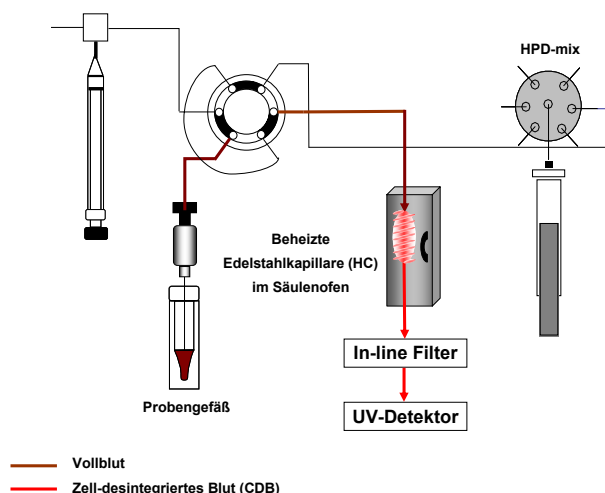


Abbildung 52: Instrumenteller Aufbau zur Untersuchung der Robustheit der Prozessierungseinheit. Das originale Symbiosis™-Pharma System wurde auf die essentiellen Einheiten (Injektionseinheit, beheizte Edelstahlkapillare (HC) im Säulenofen, Hochdruckkolbenpumpe (HPD) und UV-Detektor) minimiert.

Das System zur Untersuchung der Robustheit der Prozessierungseinheit besteht aus der Misch- und Injektionseinheit, einer Injektionsschleife, einem 6-Wege-Schaltventil, einer Hochdruckkolbenpumpe, einer beheizten Edelstahlkapillare, einem In-line Filter und einem UV-Detektor. In der beheizten Edelstahlkapillare wird Vollblut in die Matrix Zell-desintegriertes Blut (CDB) umgewandelt.

Über die Schaltventile wird der Pumpenfluss gesteuert. Bei einem Prozessierungszyklus wird die Vollblutprobe über die Spritzennadel in die Probenschleife eingebracht bzw. dosiert. Nach Schaltung des Injektionsventils wird die Probe mit Hilfe der mobilen Phase durch die beheizte Edelstahlkapillare befördert.

Imitation der Entstehung eines „Biofilms“

Bei der mehrfachen Injektion biologischer Proben bilden sich im Laufe der Zeit Ablagerungen an den Innenwänden der Kapillaren. Bei prozessierten Vollblutproben, deren Gesamtproteinmenge durch die nicht abgetrennten Zellen wesentlich höher ist als bei Plasmaproben, werden daher vermehrte Protein-Ablagerungen erwartet. Es ist davon auszugehen, dass im Bereich der beheizten Edelstahlkapillare das größte Risiko der Bildung von Ablagerungen besteht. Um das Ausmaß des Risikos der Bildung von Ablagerungen in dem Bereich der beheizten Edelstahlkapillare zu bestimmen, wurde die Entstehung eines „Biofilms“ simuliert.

Dazu wurden Vollblutproben so oft in das System injiziert und prozessiert, bis der Rückdruck im System messbar anstieg. Als obere Grenze wurde ein Rückdruck von 100bar eingestellt.

Zusammensetzung der Proben

Das Blut immunsupprimierter Patienten weist zumeist einen erniedrigten Hämatokrit auf [285]. Die Blutzellen sind oft auf die Hälfte reduziert. Um die Vollblutproben bestmöglich zu simulieren und um die Viskosität der Probe herabzusetzen, wurden Vollblutproben gesunder Probanden mit Spenderplasma der Gruppe AB entsprechend verdünnt. Plasma der Gruppe AB wurde bewusst gewählt, da es weder Antikörper gegen Blutgruppe A noch Antikörper gegen die Blutgruppe B aufweist. So wurde eine Agglutination der Probe ausgeschlossen. Milojković konnte zeigen, dass der Zusatz von organischem Modifier eine verbesserte Desintegration der Blutzellen bewirkt [7]. Zusätzlich wird die Zugabe des Internen Standards für die Quantifizierung erleichtert. Deshalb wurden den Proben ebenfalls 5vol.% Acetonitril (ACN), bezogen auf den Anteil an Vollblut, hinzugesetzt. Die genaue Zusammensetzung der Probenmischung entspricht Mischung 1 in Tabelle 6.

Prozessierungszyklus

Der Prozessierungszyklus besteht aus folgenden drei Schritten:

- Im ersten Konditionierungsschritt werden alle Kapillaren, ausgehend von der Hochdruckkolbenpumpe über die Injektionsschleife und die beheizte Edelstahlkapillare bis zum UV-Detektor für eine Minute mit Methanol bei einem Fluss von 750µL/min gespült.
- Im Anschluss daran werden dieselben Kapillaren im Äquilibrationsschritt für zwei Minuten mit einer Mischung aus Wasser/Acetonitril (95/5, v/v) ebenfalls bei einer Flussrate von 750µL/min gespült.

- Abgeschlossen wird der Analysenzyklus mit dem Prozessierungsschritt. Bei diesem Schritt werden die Kapillaren mit derselben Mischung aus Wasser/Acetonitril (95/5, v/v), diesmal jedoch für zwei Minuten, bei einer für die Probenmischung spezifischen Flussrate durchflossen. Die Flussrate wurde bewusst so gewählt, dass ein Grenzfall entsteht. Die Berechnung der Flussrate erfolgte mit den von Milojković bestimmten Prozessierungsparametern und der zugehörigen Flussformel [7] (siehe Abbildung 36). Als Prozessierungszeit wurde die Zeit verwendet, die mindestens benötigt wird, um alle Erythrozyten zu desintegrieren ($t_{\min} = 2,5\text{sec}$). Aus diesen Angaben folgt eine Flussrate von $1500\mu\text{L}/\text{min}$.

Ein kompletter Prozessierungszyklus ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Kompletter Prozessierungszyklus zur Imitation eines „Biofilms“.

| | Eluent | Flussrate [$\mu\text{L}/\text{min}$] | Zeit [min] |
|-----------|----------------------------------|--|------------|
| Schritt 1 | Methanol | 750 | 1 |
| Schritt 2 | Wasser / Acetonitril (95/5, v/v) | 750 | 2 |
| Schritt 3 | Wasser / Acetonitril (95/5, v/v) | variabel | 1 |

Prozessierungskonditionen

Für eine Prozessierung werden $50\mu\text{L}$ der Probenmischung, bestehend aus Vollblut/AB-Plasma/Acetonitril (50/45/5, v/v/v) bzw. $25\mu\text{L}$ der Probenmischung, bestehend aus Vollblut/DMSO (97,5/2,5, v/v) in die Injektionsschleife eingebracht. Die jeweilige Probe wird im dritten Schritt des Prozessierungszyklus mit der entsprechenden Flussrate durch das System befördert. Dabei wird die beheizte Edelstahlkapillare konstant bei einer Temperatur von 75°C gehalten.

Robustheit

Unter den oben beschriebenen Bedingungen konnte die Robustheit der Prozessierungseinheit für 1.000 Prozessierungszyklen nachgewiesen werden. Dabei stieg der Rückdruck des Systems nie über 20bar. Danach wurde der Versuch abgebrochen. Das Rückdruckprofil über die 1.000 Prozessierungszyklen ist in Abbildung 53 dargestellt. Die gesetzte Rückdruckgrenze ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet (rot). Während der ersten 370

Prozessierungszyklen lag der Rückdruck unverändert bei 3bar. Zwischen 370 und 650 Prozessierungszyklen stieg der Rückdruck zweimal bis auf 16bar. Ab dem 650. Prozessierungszyklus blieb der Rückdruck konstant unter 5bar.

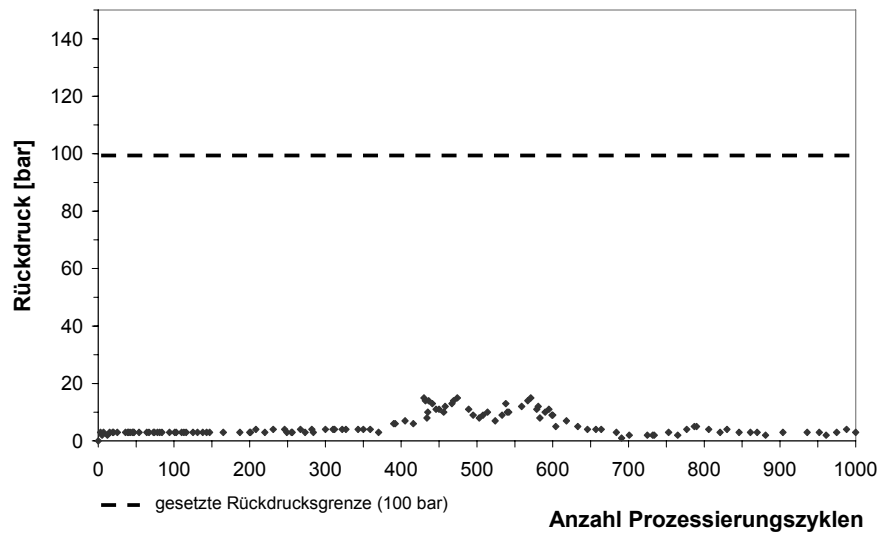


Abbildung 53: Robustheit der Prozessierungseinheit: Rückdruckprofil über 1.000 Prozessierungszyklen.

Während der insgesamt 1.000 Prozessierungszyklen wurde keine Rückdruckerhöhung detektiert. Unter den gegebenen Bedingungen ist daraus zu folgern, dass die Prozessierungseinheit über 1.000 Prozessierungszyklen stabil ist. Es ist davon auszugehen, dass sich zwischendurch Ablagerungen bilden, die den Kapillarradius reduzieren und so zu einer Erhöhung des Rückdruckes führen. Unter den gewählten Bedingungen werden diese Ablagerungen auch wieder abgebaut.

Bekannt ist, dass langes Heizen bei hohen Temperaturen zu Instabilitäten der Erythrozyten und schließlich zu einer Denaturierung von Proteinen führt [286-287]. Nachweislich kommt es ab 49°C zu einer höheren Viskosität des Blutes durch verminderte Deformierbarkeit [253, 288]. Eine stark erhöhte Viskosität, die bis zur Gelbildung führen kann, wird zusätzlich durch Denaturierung von Hämoglobin hervorgerufen [287]. Mitunter stellt eine solche Gelbildung durch denaturiertes Hämoglobin das größte Risiko für ein vollautomatisches Analysengerät mit integrierter Hitzeschockbehandlung dar. Ein Anlagern von weiteren Zellbestandteilen und ein zwischenzeitliches Austrocknen können zu einer vollständigen Verstopfung der Kapillaren führen. Demnach darf bei einer Hitzeschockbehandlung niemals Gelbildung erfolgen. Gleichzeitig sollten bei der Zerstörung der Erythrozyten möglichst kleine Fragmente entstehen.

3.4.1.2 Bestimmung der Robustheit der Kartuschen

Damit ein Analysensystem kommerziell anwendbar ist, sind u.a. niedrige Analysenkosten von Bedeutung. Zu dem hohen materiellen Aufwand tragen die verwendeten, kostenintensiven Einmalkartuschen bei. Bei verlustfreier Wiederverwendung könnte Material gespart und die Kosten reduziert werden. Aus diesem Grund wurde die am stärksten mit Matrixbestandteilen belastete erste Kartusche (LiChrospher[®]ADS RP4) der entwickelten MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (im Triple-Kartuschen Modus) auf Wiederverwendung untersucht.

Die Überprüfung der Robustheit dieser Kartusche erfolgte durch mehrfache Injektion von Mischung 2 (siehe Tabelle 6) auf dieselbe Kartusche. Diese Mischung wurde bewusst gewählt, da sie der späteren Probenzusammensetzung entspricht. Sie besteht aus einer fast unverdünnten Vollblutprobe (97,5vol.%) und hat damit einen hohen zellulären Anteil. Sie beinhaltet Dimethylsulfoxid (DMSO) als organischen Modifier mit einem 2,5vol.% Anteil, bemessen auf die gesamte Probe.

Nach jeder Injektion erfolgte die Beladung der Kartusche mit Wasser/Acetonitril (95/5, v/v). Die Kartusche unterlag zwischen den einzelnen Prozessierungszyklen einer vollständigen Konditionierung. Sie wurde dabei so programmiert, dass sie ständig in der Klemme eingespannt blieb. So konnte vermieden werden, dass durch unterschiedliches Einspannen ein veränderter Rückdruck aufgebaut wird. Die Versuche erfolgten sowohl mit als auch ohne In-line Filter (siehe Abbildung 76). Beide Versuche wurden mit drei verschiedenen Kartuschen wiederholt. Im System erfolgte die Aufzeichnung des Rückdruckes. Bei 100bar wurde der Versuch abgebrochen.

Instrumenteller Aufbau

Für die Untersuchungen zur Robustheit der Kartuschen wurde ein auf die essentiellen Einheiten minimierter instrumenteller Aufbau gewählt. Der Aufbau wird in Kapitel 3.4.1.1 beschrieben. Erweitert wird dieser durch zwei 6-Wege-Ventile und einen Kartuschenhalter. Der erweiterte instrumentelle Aufbau ist in Abbildung 54 dargestellt.

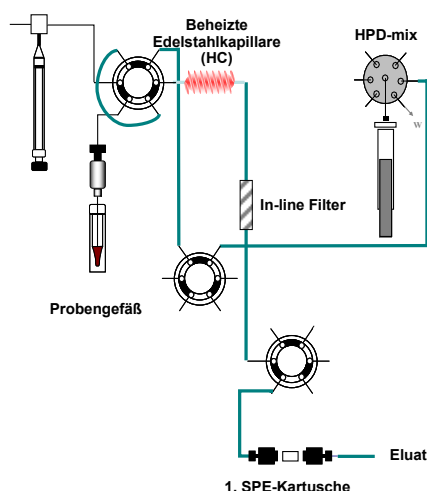


Abbildung 54: Instrumenteller Aufbau zur Bestimmung der Robustheit der Kartusche.

Robustheit der Kartusche

Tabelle 20 zeigt die erzielten Rückdrücke bei der Bestimmung der Robustheit auf verschiedenen Kartuschen. Auffällig ist, dass alle Kartuschen einen unterschiedlichen Ausgangsdruck aufweisen. Alle Kartuschen hielten mehrfachen Fraktionierungszyklen stand. Ein eindeutiger Trend der Rückdruckzunahme ist nicht zu erkennen.

Tabelle 20: Bestimmung der Robustheit der Kartuschen. Kartusche: Oasis[®] HLB (10x2mm).

| Injektion | Rückdruck mit In-Line Filter [bar] | | | Rückdruck ohne In-Line Filter [bar] | | |
|-----------|------------------------------------|-------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| | Kartusche 1 | Kartusche 2 | Kartusche 3 | Kartusche 1 | Kartusche 2 | Kartusche 3 |
| 1 | 52 | 34 | 42 | 27 | 16 | 55 |
| 2 | 49 | 40 | 56 | 39 | 36 | 31 |
| 3 | 46 | 47 | 35 | 46 | 53 | 68 |
| 4 | 55 | 51 | 50 | 47 | 62 | 98 |
| 5 | 78 | 56 | 50 | 48 | 69 | 141 |
| 6 | 75 | 71 | 53 | 56 | 85 | |
| 7 | 87 | 74 | 59 | 59 | 94 | |
| 8 | 96 | 101 | 68 | 72 | 94 | |
| 9 | 92 | | 73 | 68 | 89 | |
| 10 | 104 | | 79 | 85 | 76 | |
| 11 | | | 82 | 73 | 83 | |
| 12 | | | 91 | 84 | 79 | |
| 13 | | | 105 | 103 | 92 | |
| 14 | | | | | 108 | |

Der In-line Filter weist einen kleinsten Durchmesser von einem Mikrometer auf. Die Siebe der Kartuschen besitzen einen durchschnittlichen Porendurchmesser von 30µm. Trotz dieses deutlichen Unterschiedes zeigt kein System einen schnelleren Rückdruckaufbau. Alle

Kartuschen hielten mindestens fünf Zyklen stand. Ebenso ist kein gleichmäßiger Anstieg des Rückdruckes zu erkennen. Auffällig ist jedoch, dass der Rückdruck verschiedener, frischer Kartuschen erheblichen Schwankungen unterliegt. Weiterhin ist in einem on-line SPE-LC System der zusätzlich von der analytischen Säule hervorgerufene Rückdruck beim Transferschritt zu berücksichtigen. Da die entwickelte SPE-MD-POPLC-MS/MS Plattform aufgrund seiner PEEK-Verbindungen nur ca. 200bar standhält, ist von einer Mehrfachverwendung der ersten Kartusche daher abzusehen. Ausgenommen davon ist die Verwendung einer LiChrospher® ADS RP4 Kartusche, die aufgrund ihrer Materialeigenschaften auch für eine Mehrfachverwendung geeignet ist. Erfahrungsgemäß kann die zweite Kartusche (ProntoSil PLR), auf jeden Fall auch die dritte Kartusche (Oasis® MCX) gewaschen, neu konditioniert und wieder verwendet werden.

3.4.2 Vergleich der Robustheit einer konventionellen on-line SPE-LC-MS/MS Methode mit und ohne integrierter Hitzeschockbehandlung bei der Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut

Im folgenden Kapitel erfolgt die Darstellung der Untersuchungsergebnisse der Robustheit einer on-line SPE-LC-MS/MS Methode mit integrierter Hitzeschockbehandlung für die Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut. Dazu wurde die Robustheit dieser Methode mit derselben Methode ohne integrierte Hitzeschockbehandlung verglichen. Es erfolgte der Vergleich durch mehrere unabhängige Versuche. Als Referenz diente eine off-line, mit flüssigem Stickstoff hergestellte CDB-Probe (siehe Kapitel 3.1.2). Für den Vergleich wurden jeweils eine Vollblutprobe, eine off-line hergestellte Hitzeschock-behandelte CDB-Probe und eine Referenz-Probe untersucht. Die Vollblutproben stammten, wenn nicht anders beschrieben, von gesunden Probanden. Ein Aliquot wurde nativ belassen. Die Prozessierung eines weiteren Aliquots erfolgte unter Standardbedingungen bei 75°C, 16 Sekunden im Wasserbad (CDB). Die Referenzprobe wurde durch zweimaliges Tieffrieren in flüssigem Stickstoff hergestellt.

3.4.2.1 Untersuchungen zur Wiederfindung der Modellanalyte aus verschiedenen Matrices

Als erstes erfolgten Untersuchungen zur Wiederfindung ausgewählter Modellanalyten aus Vollblut und aus CDB. Dazu wurden Patientenproben verwendet, die bereits im Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Universität München nach Proteinpräzipitation vermessen worden waren (Methode siehe). Diese Ergebnisse wurden hier als 100%-Wert herangezogen. Die Patienten unterlagen einer Tacrolimus- (hydrophilster Analyt aus der Gruppe der in dieser Arbeit untersuchten Modellanalyte) bzw. einer Ciclosporin A-Therapie (hydrophobster Analyt der in dieser Arbeit untersuchten Modellanalyte). Ein Aliquot jeder Patientenprobe wurde nativ belassen (Vollblutprobe). Die off-line Prozessierung eines weiteren Aliquots erfolgte unter Standardbedingungen bei 75°C für 16 Sekunden im Wasserbad (CDB-Probe). Alle Proben wurden in ein konventionelles SPE-LC-MS/MS System injiziert (Methode siehe) und analysiert. Analysen erfolgten aus den verschiedenen Matrices jeweils mit einer niedrigen, einer mittleren und einer hohen therapeutischen Konzentration an Modellanalyt. Auch der Einfluss des Injektionsvolumens wurde untersucht. Die Prüfung erfolgte für unterschiedliche Injektionsvolumina (5µL, 10µL und 25µL) jeder therapeutischen Konzentration.

Bestimmung von Tacrolimus aus verschiedenen Matrices

Abbildung 55 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung von Tacrolimus aus Vollblut und aus CDB. Diese Messergebnisse unterliegen dem direkten Vergleich mit dem Referenzwert. Sowohl bei niedriger als auch bei mittlerer Konzentration sind die Messwerte der selbst vermessenen Patientenproben aus Vollblut und aus CDB mit den 100%-Werten vergleichbar. Bei hohen Tacrolimuskonzentrationen weichen die ermittelten Werte für Vollblut und für CDB von den 100%-Werten ab: sie sind niedriger. In allen Injektionsvolumina werden ähnliche Tacrolimuskonzentrationen nachgewiesen.

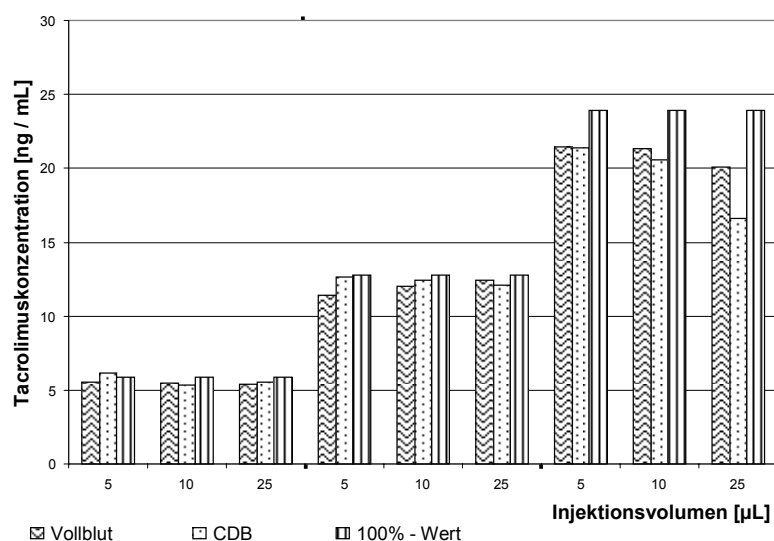


Abbildung 55: Bestimmung von Tacrolimus aus Vollblut und aus CDB. Vergleichswerte: Messergebnisse des Institutes für Klinische Chemie des Klinikums der Universität München (100%-Wert); Probe: Patienten, die mit unterschiedlichen therapeutischen Konzentrationen an Tacrolimus behandelt wurden; Probenvorbereitung Vollblut: keine; Probenvorbereitung; CDB: Prozessierung (off-line) unter Standardbedingungen bei 75°C für 13 Sekunden im Wasserbad; Interner Standard: Ascomycin in 2,5vol.% DMSO; System: Konventionelle SPE-LC-MS/MS; 100%-Wert: Konventionelle SPE-LC-MS/MS nach Proteinpräzipitation von Vollblut (vollständige Parameter für Systeme siehe).

Den Untersuchungsergebnissen ist zu entnehmen, dass die ermittelten Tacrolimuswerte im niedrigen und mittleren therapeutischen Konzentrationsbereich mit den 100%-Werten übereinstimmen. Es kann daher festgehalten werden, dass die Matrix bei niedrigen und mittleren therapeutischen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Wiederfindung hat. Dagegen fällt die Wiederfindung aus Vollblut und CDB bei hohen therapeutischen Konzentrationen im Vergleich zur 100%-Messung ab. Da die Wiederfindung an Tacrolimuskonzentration aus allen Injektionsvolumina ähnlich ist, ist festzuhalten, dass das Injektionsvolumen keinen Einfluss auf die Wiederfindung hat.

Bestimmung von Ciclosporin A aus verschiedenen Matrices

Abbildung 56 zeigt die Ergebnisse der oben beschriebenen Untersuchungen mit Patientenproben, die Ciclosporin A enthielten. Dass das Injektionsvolumen keinen Einfluss auf die Wiederfindung hat, wurde hier bereits unterstellt. Die ermittelten Konzentrationen für

Ciclosporin A aus Vollblut und CDB weichen stärker vom 100%-Wert ab. Bei mittlerer und hoher therapeutischer Konzentration liegen die ermittelten Werte unter 100%.

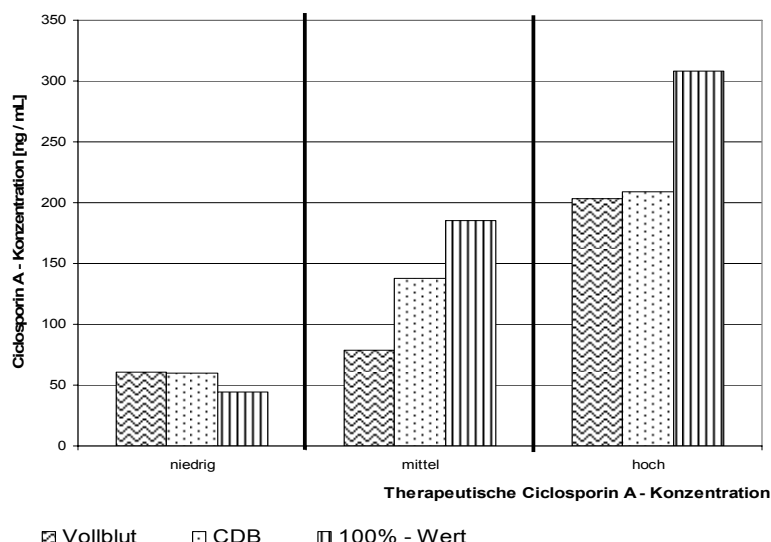


Abbildung 56: Bestimmung von Ciclosporin A aus Vollblut und aus CDB. Vergleichswerte: Messergebnissen des Institutes für Klinische Chemie des Klinikums der Universität München (100%-Wert); Probe: Patienten, die mit unterschiedlichen therapeutischen Konzentrationen an Ciclosporin A behandelt wurden; Probenvorbereitung Vollblut: keine, n=3; Probenvorbereitung CDB: Prozessierung (off-line) unter Standardbedingungen bei 75°C für 13 Sekunden im Wasserbad, n=3; Interner Standard: Ascomycin in 2,5vol.% DMSO; System: Konventionelle SPE-LC- MS/MS; System 100%-Wert: Konventionelle SPE-LC-MS/MS nach Proteinpräzipitation (vollständige Parameter für Systeme siehe).

Die ermittelten Werte stimmen mit dem 100%-Wert in niedriger therapeutischer Konzentration überein. Die selbst bestimmten Vollblut- und CDB-Werte zeigen bei mittlerer und hoher therapeutischer Konzentration niedrigere Werte als der 100%Wert. Im direkten Vergleich zu den Untersuchungen zur Wiederfindung von Tacrolimus aus den gleichen Matrices fällt auf, dass die Matrix bei dem hydrophoberen Analyten Ciclosporin A einen deutlich höheren Einfluss hat. Wie Abbildung 60 zu entnehmen ist, kommt es zum Zeitpunkt der Elution von Tacrolimus und seines verwendeten Internen Standards Ascomycin (kleiner Peak des roten Chromatogramms) zu einer Verstärkung der Ionisation. Die Elution von Ciclosporin A (großer Peak des roten Chromatogramms) liegt in einem Bereich mit neutraler Ionisation. Der Interne Standard ist die Berechnungsgrundlage für die Wiederfindung der Analyte. Daher wird der systematische Fehler bei der Berechnung der Wiederfindung von

Tacrolimus in der Berechnung eliminiert, während er bei der Berechnung der Wiederfindung von Ciclosporin A zu niedrigeren Wiederfindungsraten führt.

3.4.2.2 Untersuchungen zur Verschleppung von Hämoglobin im Analysensystem

Um das Ausmaß einer unerwünschten Verschleppung von Hämoglobin bis in den Detektor aufzuzeigen, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Für diese wurde Hämoglobin auf unterschiedliche Weise im Transferschritt eines konventionellen SPE-LC Systems nachgewiesen. Ziel der Untersuchungen war, unterschiedliche Verschleppungsraten des Hämoglobins aus der Matrix Vollblut im Vergleich zu CDB nachzuweisen. In vielen Experimenten diente eine durch zweimaliges Ausfrieren in flüssigem Stickstoff hergestellte CDB-Probe als Referenz.

Nachweis von Hämoglobin aus unterschiedlichen Matrices im Transferschritt einer konventionellen SPE-LC Methode mit einem UV/VIS Photometer

Der Nachweis von Hämoglobin im Transferschritt einer konventionellen SPE-LC Methode erfolgte nach Injektion von verschiedenen Matrices. Dafür wurde ein UV/VIS-Detektor anstelle des Massenspektrometers direkt an das SPE-LC System gekoppelt. Nach Injektion und Analyse der verschiedenen Matrices wurde das Hämoglobin bei 429nm detektiert.

Abbildung 57 zeigt den Vergleich verschiedener Matrices. In allen Chromatogrammen ist ein Injektionspeak zwischen 2,8-3,4 Minuten zu sehen.

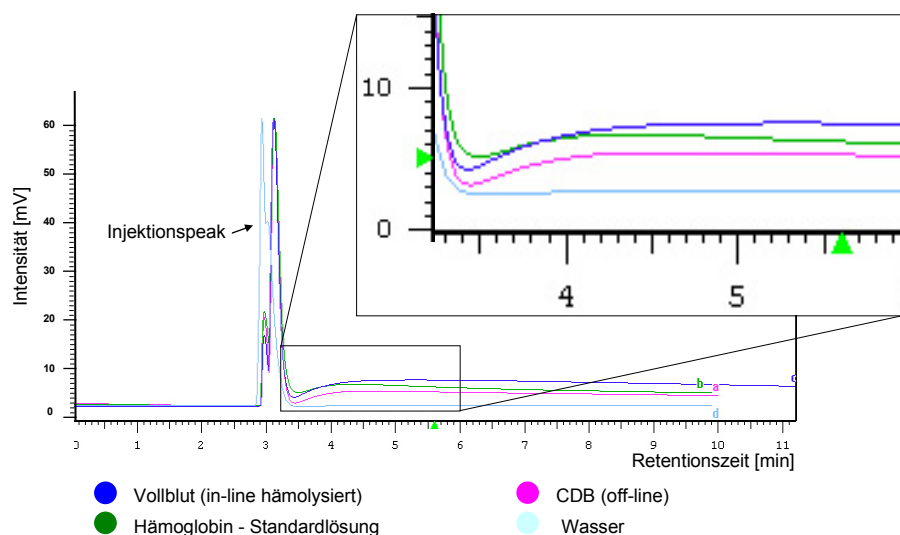


Abbildung 57: Nachweis von Hämoglobin im Transferschritt. Methode: konventionelle SPE-LC-MS/MS (vollständige Parameter siehe). Proben: Vollblut eines gesunden Probanden; Probenaufbereitung Vollblut: keine; Probenaufbereitung CDB: Prozessierung unter Standardbedingungen bei 75°C 16 Sekunden im Wasserbad; Hämoglobin-Standardlösung: 150mg/mL in mobiler Phase, Injektionsvolumen: 25µL; Fraktionierung: Wasser/Acetonitril (95/5, v/v) bei 250µL/min für 1 Minute, danach Wasser/Acetonitril (95/5, v/v) bei 3mL/min für 1 Minute; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (80/20, v/v); Detektion: UV/VIS bei 429nm.

Der Anstieg der Basislinie ab 3,5 Minuten ist nur bei der Vollblut-, bei der CDB- und bei der Hämoglobinprobe zu sehen. Bei der Wasserprobe bleibt die Basislinie auf dem Anfangsniveau. Den Messergebnissen ist zu entnehmen, dass bei den drei erstgenannten Proben vermehrt Hämoglobin gemessen wird. Dabei ist die Verschleppung des Hämoglobins nach Injektion einer Vollblutprobe am größten. Die Injektion einer Hämoglobin-Standardlösung mit 150mg/mL ist eher als Referenz zu betrachten. Nach Injektion von CDB wird im Vergleich zu der Vollblutprobe weniger Hämoglobin verschleppt. Die injizierte Wasserprobe wurde als Kontrolle verwendet und zeigt erwartungsgemäß kein Hämoglobin. Diese Untersuchungen zeigen einen ersten Vorteil für die Analyse von Immunsuppressiva aus CDB-Proben.

Photometrische Bestimmung von Hämoglobin

Es erfolgte ein zweiter unabhängiger Nachweis von Hämoglobin im Transferschritt. Dafür wurde die Probe einer Reaktion mit Drabkin's Reagenz unterzogen und anschließend die Farbreaktion photometrisch detektiert. Dazu wurden Aliquote derselben oben beschriebenen

Proben in das konventionelle SPE-LC-MS/MS System injiziert und analysiert. Das Transfer-volumen von 750µL wurde aufgefangen, unter Stickstoff eingedampft und mit 1mL Drabkin's Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Detektion bei 546nm gegen Wasser.

In Tabelle 21 sind die Absorptionsdifferenzen verschiedener Matrices im Vergleich zu Wasser zu sehen. Die Absorptionsdifferenz von CDB im Vergleich zu Wasser zeigt einen etwas geringeren Wert als die Absorptionsdifferenz von Vollblut im Vergleich zu Wasser. Die mit Stickstoff behandelte Referenzprobe weist, im Vergleich mit den beiden anderen Matrices, eine deutlich geringere Absorptionsdifferenz im Vergleich zu Wasser auf.

Tabelle 21: Nachweis von Hämoglobin im Transferschritt. Methode: konventionelle SPE-LC-MS/MS;

Proben: Vollblut eines gesunden Probanden; Probenaufbereitung Vollblut: keine;

Probenaufbereitung CDB: Prozessierung unter Standardbedingungen bei 75°C für 16 Sekunden im Wasserbad; Probenaufbereitung CDB(N₂): Zweimaliges Ausfrieren in flüssigem

Stickstoff; Injektionsvolumen: 25µL; System: konventionelle SPE-LC-MS/MS (vollständige Parameter siehe);

Testvolumen: 750µL Transfervolumen, unter Stickstoff eingengt, mit 1mL Drabkin's versetzt, 15min bei Raumtemperatur inkubiert und photometrisch bei 546nm gegen Wasser vermessen.

| | Absorptionsdifferenz im Vergleich zu Wasser |
|--------------------------------|---|
| Vollblut (in-line hämolysiert) | 0,022 |
| CDB (off-line) | 0,020 |
| CDB (N ₂) | 0,005 |

Die Messwerte zeigen, dass die mit flüssigem Stickstoff behandelte Probe (CDB(N₂)) sehr viel weniger Hämoglobin im Transferschritt aufweist als die anderen beiden Proben. Wie die Untersuchungen (siehe Kapitel 3.1) ergaben, besteht diese CDB(N₂)-Probe aus kleinen subzellulären Partikeln. Eine Erklärung für den deutlich geringeren Hämoglobinwert kann die komplette Desintegration bei der Prozessierung geben. Dabei wird der Zellinhalt, d.h. das Hämoglobin vollständig freigesetzt. Beim Fraktionierungsschritt kann dieses daher sehr sauber abgetrennt werden. Ein Vorteil der Analyse aus einer CDB-Probe im Vergleich zu einer Vollblutprobe wird hier nur geringfügig sichtbar. Jedoch ist bei der Vollblutprobe davon auszugehen, dass durch in-line Hämolysen ebenfalls Zellinhalt freigesetzt wird. Die Zellhüllen, die sogenannten „Ghosts“, können aber nicht weiter zerstört werden. Auf dem Sieb der SPE-Säule und im SPE-Material können sich diese „Ghosts“ verfangen und Hämoglobin einschließen. Hämoglobin wird dann im nächsten Schritt wieder abgelöst und gelangt so im Transferschritt in den Detektor. Eine durch Hitzeschockbehandlung entstandene CDB-Probe

besteht, wie auch die CDB(N₂)-Probe, aus subzellulären Partikeln. Es kommt daher ebenfalls zu einer vollständigen Desintegration.

Photometrische Bestimmung von Protein

Als indirekter Nachweis von Hämoglobin im Transferschritt diente ein allgemeiner Proteinnachweis. Hier wurde in derselben Weise vorgegangen wie bei dem beschriebenen Hämoglobinnachweis mit Drabkin's Reagenz. Der einzige Unterschied bestand in dem Zusatz von 1mL BCA-Reagenz anstelle des Drabkin's Reagenzes zu dem eingegengten Transfervolumen. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 578nm gegen Wasser vermessen.

Tabelle 22 zeigt, dass die CDB-Probe im Vergleich zu Wasser eine geringere Absorptionsdifferenz aufweist, als die Absorptionsdifferenz von Vollblutprobe im Vergleich zu Wasser. Eine deutlich kleinere Absorptionsdifferenz zeigt die mit Stickstoff behandelte CDB-Probe.

Tabelle 22: Nachweis von Protein im Transferschritt. Methode: konventionelle SPE-LC-MS/MS. Proben:
Vollblut eines gesunden Probanden; Probenaufbereitung Vollblut: keine; Probenaufbereitung
CDB: Prozessierung unter Standardbedingungen bei 75°C für 16 Sekunden im Wasserbad;
Probenaufbereitung CDB(N₂): Zweimaliges Ausfrieren in flüssigem Stickstoff;
Injektionsvolumen: 25µL; System: konventionelle SPE-LC-MS/MS (vollständige Parameter
siehe);
Testvolumen: 750µL Transfervolumen, unter Stickstoff eingengt, mit 1mL BCA-Reagenz
versetzt, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und photometrisch bei 578nm gegen
Wasser vermessen.

| | Absorptionsdifferenz im Vergleich zu Wasser |
|--------------------------------|---|
| Vollblut (in-line hämolysiert) | 0,286 |
| CDB (off-line) | 0,273 |
| CDB (N ₂) | 0,116 |

Diese Untersuchungen führten zu ähnlichen Ergebnissen wie die photometrische Bestimmung von Hämoglobin. Auch hier konnte ein leichter Vorteil für die Analyse von Immunsuppressiva aus CDB im Vergleich zu einer Analyse aus Vollblut herausgearbeitet werden. Die Begründung ist analog zur photometrischen Bestimmung von Hämoglobin, diesmal jedoch bezogen auf alle in Vollblut enthaltenen Proteine.

Photometrische Bestimmung von Eisenionen aus Hämoglobin

Ein weiterer indirekter Nachweis von Hämoglobin im Transferschritt erfolgte über die Bestimmung von Eisen. Dazu wurde in gleicher Weise vorgegangen, wie zuvor beschrieben. Das Transfervolumen von 750 μL wurde aufgefangen. In einem Olympus AU 2700 Analysengerät erfolgte die photometrische Vermessung bei 567nm, nachdem zweiwertiges Hämoglobin- und dreiwertiges Transferrineisen mit einem spezifischen Reagenz umgesetzt wurden. Bei diesen Untersuchungen erfolgte eine Mittelwertsbestimmung aus 10 Transfervolumina.

In Tabelle 23 sind die Messwerte der photometrischen Untersuchungen der Transfervolumina aufgezeigt. Für beide CDB-Proben ergaben sich geringere Konzentrationen an Eisenionen als bei der Vollblutprobe.

Tabelle 23: Nachweis von Eisenionen im Transferschritt. Methode: konventionellen SPE-LC-MS/MS;

Probe: Vollblut eines gesunden Probanden; Probenaufbereitung Vollblut: keine;

Probenaufbereitung CDB: Prozessierung unter Standardbedingungen bei 75°C, 16 Sekunden im Wasserbad; Probenaufbereitung CDB(N₂): Zweimaliges Ausfrieren in flüssigem Stickstoff; Injektionsvolumen: 25 μL ; System: konventionelle SPE-LC-MS/MS (vollständige Parameter siehe);

Testvolumen: 7,5mL Transfervolumen; Detektion: photometrisch bei 567nm.

| | Eisenionen [$\mu\text{g/dL}$] |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Vollblut (in-line hämolysiert) | 2 |
| CDB (off-line) | < 1 |
| CDB (N ₂) | < 1 |

Erwartungsgemäß zeigen beide CDB-Proben eine geringere Konzentration an Eisenionen als die Vollblutprobe. Damit wird nach Injektion einer CDB-Probe in ein konventionelles SPE-LC-MS/MS System weniger Hämoglobin bis in den Detektor verschleppt. Jedoch zeigen die Werte auch, dass die Methode nicht sensitiv genug ist, um stärker zu differenzieren.

Bestimmung von Eisen mit Hilfe der Atom-Absorptionsspektrometrie

Die Bestimmung des Anteils an zentralem Eisenion des Hämoglobinmoleküls erfolgte in einer weiteren unabhängigen Untersuchung mit Hilfe der Atom-Absorptionsspektrometrie. Dazu wurde, wie zuvor beschrieben, vorgegangen. Auch bei diesen Versuchen wurde ein Mittelwert aus 10 Transfervolumina bestimmt.

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Untersuchung mit Hilfe der Atom-Absorptionsspektrometrie aufgezeigt. Die CDB-Probe weist einen deutlich niedrigeren Wert auf als die Vollblutprobe. Die mit flüssigem Stickstoff behandelte Probe (CDB(N₂)) zeigt von allen untersuchten Proben die niedrigste Konzentration an Eisenionen.

Tabelle 24: Nachweis von Eisenionen im Transferschritt. Methode: konventionelle SPE-LC-MS/MS;

Probe: Vollblut eines gesunden Probanden; Probenaufbereitung Vollblut: keine;

Probenaufbereitung CDB: Prozessierung unter Standardbedingungen bei 75°C, 16 Sekunden im Wasserbad; Probenaufbereitung CDB(N₂): Zweimaliges Ausfrieren in flüssigem Stickstoff;

Injektionsvolumen: 25µL; System: konventionelle SPE-LC-MS/MS (vollständige Parameter siehe);

Testvolumen: 7,5mL Transfervolumen; Detektion: Atom-Absorptionsspektrometer.

| | Eisen [µg/L] |
|--------------------------------|--------------|
| Vollblut (in-line hämolysiert) | > 1400 |
| CDB (off-line) | 392 |
| CDB (N ₂) | 65 |

Diese Untersuchungsergebnisse zeigen einen 3-4-fach geringeren Anteil an Eisen im Transferschritt nach Injektion von CDB im Vergleich zu Vollblut. Eine mit Stickstoff behandelte Vollblutprobe ergibt einen gut 20-fach niedrigeren Anteil von Eisen im Transferschritt im Vergleich zu Vollblut.

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen weisen eine Überlegenheit bei der Analyse der Immunsuppressiva aus der Matrix CDB gegenüber der Matrix Vollblut auf. Durch einen direkt gekoppelten UV/VIS-Detektor an das konventionelle SPE-LC System konnte der unterschiedliche Hämoglobingehalt im Transferschritt nach Injektion der verschiedenen Matrices chromatographisch dargestellt werden. Sowohl der nasschemische Nachweis auf Hämoglobin als auch der nasschemische Nachweis auf Protein allgemein zeigten leichte Vorteile der Matrix CDB gegenüber Vollblut. Der Nachteil der Ergebnisse besteht darin, dass diese Untersuchungen Vergleichsmessungen und deshalb nicht quantifizierbar sind. Die photometrische Untersuchung auf Eisenionen war zu unempfindlich für die Differenzierung zwischen der CDB-Probe und der mit Stickstoff behandelten CDB-Probe. Die Messung des Hämoglobineisens im Transferschritt mit Hilfe der Atom-Absorptionsspektrometrie zeigte auf quantitative Weise den Unterschied bei der Analyse der verschiedenen Matrices. Die erhöhte Robustheit der Methode mit integrierter Hitzeschockbehandlung gegenüber einer Methode, die auf einer Hämolysen von Vollblut beruht, konnte eindeutig nachgewiesen werden.

3.4.3 Vergleich verschiedener Innendurchmesser einer POPLC-Säule

Um auf verschiedenen Anforderungen und Anwendungsbereiche besser eingehen zu können, erfolgten Untersuchungen zum Einfluss des Innendurchmessers einer POPLC-Säule. Dafür wurden Bestimmungen einer ausgewählten POPLC-Segmentkombination (siehe Kombination I in Kapitel 3.3.4.2) mit 3mm Innendurchmesser und mit einem 2mm Innendurchmesser verglichen. Alle Untersuchungen wurden unter identischen chromatographischen Bedingungen durchgeführt.

Abbildung 58 zeigt die Überlagerung der Chromatogramme aller vier Zielanalyte mit ihren Internen Standards auf einer POPLC-Säulenkombination mit 3mm Innendurchmesser. Deutlich zu erkennen sind die Signale für Ciclosporin A (blau) und Ciclosporin D (rot). Ebenfalls zu sehen ist das Signal für Everolimus bei 2,5 Minuten. Die Signale für Ascomycin, Tacrolimus, Sirolimus und Desmethoxysirolimus sind im Verhältnis zu den Ciclosporinen so klein, dass sie in der vorliegenden Grafik nicht aufgelöst werden. Die höchste Intensität zeigt das Signal von Ciclosporin A mit $6,45 \times 10^5$ cps. Die Gesamtanalysenzeit beträgt 8,0 Minuten.

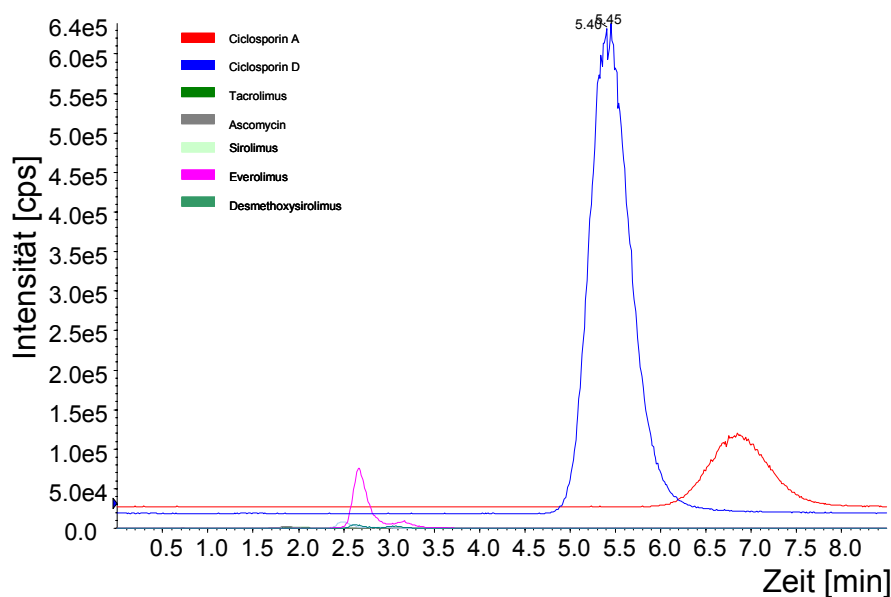


Abbildung 58: Testchromatogramm einer POPLC-Säule mit 3mm Innendurchmesser. POPLC-Säulenkombination: 20mm ProntoSil 100-5-C18 SH 2 + 20mm ProntoSil 200-5-PLR + 30mm ProntoSil 100-5-CN 2 + 10mm ProntoSil 100-5-Phenyl 2, temperiert im Wasserbad auf 60°C; Injektionsvolumen: 25µL einer präzipitierten Vollblutprobe, dotiert mit den vier Immunsuppressiva Ciclosporin A (1000ng/mL), Tacrolimus (40ng/mL), Sirolimus (45ng/mL) und Everolimus (45ng/mL) mit den Internen Standards Ciclosporin D (60ng/mL), Ascomycin (20ng/mL) und Desmethoxysirolimus (25ng/mL); Mobile Phase: Methanol/10mmolare Ammoniumacetatlösung (75/25, v/v); Flussrate: 900µL/min; 8.50 min; Detektor: MDS SCIEX API 5000 LC/MS/MS System mit QJet Ion Guide.

In Abbildung 59 ist die Überlagerung der Chromatogramme aller vier Zielanalyte mit ihren Internen Standards auf einer POPLC-Säulenkombination mit 2mm Innendurchmesser gezeigt. Bis auf das Desmethoxysirolimus sind hier alle Analyte gut zu erkennen. Die Reihenfolge der Elution der Analyte ist erwartungsgemäß identisch mit der Elution der Analyte auf einer POPLC-Segmentskombination mit 3mm Innendurchmesser. Die höchste Intensität zeigt hier ebenfalls das Signal von Ciclosporin A mit $8,5 \times 10^5$ cps. Die benötigte Gesamtanalysenzeit beträgt jedoch nur 5,0 Minuten.

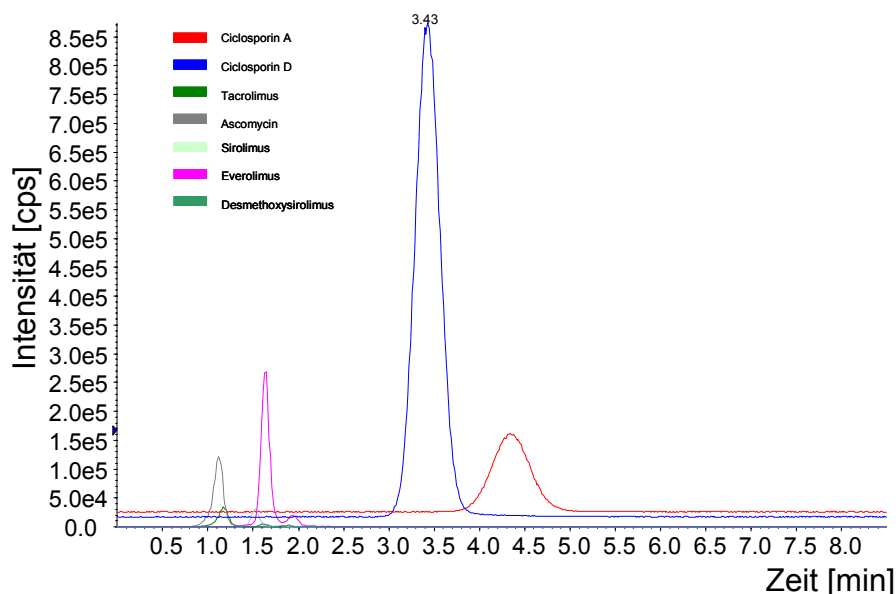


Abbildung 59: Testchromatogramm einer POPLC-Säule mit 2mm Innendurchmesser. POPLC-Säulenkombination: 20mm ProntoSil 100-5-C18 SH 2 + 20mm ProntoSil 200-5-PLR + 30mm ProntoSil 100-5-CN 2 + 10mm ProntoSil 100-5-Phenyl 2, temperiert im Wasserbad auf 60°C; Injektionsvolumen: 25µL einer präzipitierten Vollblutprobe, dotiert mit den vier Immunsuppressiva Ciclosporin A (1000ng/mL), Tacrolimus (40ng/mL), Sirolimus (45ng/mL) und Everolimus (45ng/mL) mit den Internen Standards Ciclosporin D (60ng/mL), Ascomycin (20ng/mL) und Desmethoxysirolimus (25ng/mL); Mobile Phase: Methanol/10mmolare Ammoniumacetatlösung (75/25, v/v); Flussrate: 900µL/min; 8.50 min; Detektor: MDS SCIEX API 5000 LC/MS/MS System mit QJet Ion Guide.

Wird eine POPLC-Säule mit 2mm Innendurchmesser gewählt, so resultiert unter den gegebenen Bedingungen eine ähnlich, wenn nicht sogar eine verbesserte Auflösung der einzelnen Signale im Chromatogramm bei kürzerer Analysenzeit. Die Signale sind im Mittel ca. ein Drittel erhöht. Der Druck lag im Durchschnitt ca. 50 bar über dem Druck mit einer POPLC-Säule mit 3mm Durchmesser. Gleiches gilt für die Analyse einer Standardlösung (Chromatogramme nicht gezeigt).

Für die zwingend notwendige Analyse von kleinen Probenvolumina, konnte somit eine höhere Nachweisempfindlichkeit durch Verkleinerung des Innendurchmessers der POPLC-Säule gezeigt werden. Auf diese Weise wird eine höhere Massenselektivität erreicht. Nicht außer Betracht gelassen werden darf aber in diesem Falle, dass gleiche chromatographische Bedingungen zu einer höheren linearen Flussgeschwindigkeit führen.

Steht jedoch ein großes Probenvolumen zur Verfügung, ist die Nachweisempfindlichkeit auf einer analytischen Säule mit größerem Säulendurchmesser verbessert. Es steht mehr Masse an stationärer Phase für Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase zur Verfügung. Daraus resultiert eine höhere theoretische Bodenzahl.

Für einen direkten Vergleich ist demnach das injizierte Probenvolumen an den Säulendurchmesser anzupassen. Dabei ist das Volumen der Säule proportional zum Durchmesser.

3.4.4 Bestimmung von Matrixeffekten der biologischen Flüssigkeit CDB bei der Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut nach on-line Probenaufbereitung über verschiedene Plattformen.

Die Bestimmung des Ausmaßes an Matrixeffekten erfolgte über die Aufnahme von Nachsäuleninfusionschromatogrammen, wie in Kapitel 2.3.5.3 beschrieben. Nachsäuleninfusionschromatogramme werden häufig zur Bestimmung von Matrixeffekten genutzt. Sie geben Aufschluss über das chromatographische Zeitprofil und das Ausmaß der interferierenden Substanzen. Interferierende Matrixsubstanzen resultieren in Suppression bzw. in einer Verstärkung der Ionisation.

Bei diesem Experiment wird die neu entwickelte MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Triple-Kartuschen Modus) mit der eigens entwickelten Version, der MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Dualer-Kartuschen-Modus) und mit einer konventionellen SPE-LC-MS/MS Methode (Single-Kartuschen Modus) verglichen. Die genauen Parameter dieser Methoden sind in und Anhang 11 aufgeführt.

Für diesen Vergleich wurden auf jedem System sowohl Injektions- als auch Infusionschromatogramme gemessen. Die Detektion der Injektionschromatogramme erfolgte nach Injektion und Analyse einer Analytstandardlösung in das jeweilige System. Für die Detektion der Infusionschromatogramme wurde kontinuierlich eine Analytstandardlösung in das Massenspektrometer infundiert. Gleichzeitig erfolgte die Injektion einer reinen Matrixprobe (CDB). Sie wird analysiert und ihr HPLC-Eluat dem Infusionsstrom zugeleitet. Beide

Chromatogrammtypen werden übereinandergelegt. Eine ungestörte Analyse liegt vor, wenn die Basislinie eine konstante Intensität aufweist. Die Intensität sollte gegenüber einer normalen Basislinie, ohne kontinuierliche Infusion einer Analytstandardlösung sichtbar erhöht sein.

Abbildung 60 zeigt die Überlagerungen von Injektions- (rot) und Infusionschromatogrammen einer Analyse von Immunsuppressiva aus CDB mit einer konventionellen SPE-LC-MS/MS Methode (Single-Kartuschen Modus). Zu entnehmen sind die Überlagerungen der entsprechenden Chromatogramme nach Aufreinigung auf verschiedene SPE-Materialien. Untersucht wurden 1.) HySphere C2, 2.) HySphere C8 EC-SE, 3.) LiChrospher[®] ADS RP4 und 4.) Oasis[®] HLB. Das Injektionschromatogramm zeigt eine nicht optimierte Elution einer Analytstandardlösung. Es entstehen zwei Signale. Unter den gegebenen Bedingungen eluieren Ciclosporin A und D getrennt von den restlichen untersuchten Immunsuppressiva und der Internen Standards. Sie werden im ersten Signal überlagert. Alle Infusionschromatogramme zeigen einen „Schaltpeak“ bei 2,7min. Dieser entsteht aufgrund der Säulenschaltung. Zu diesem Zeitpunkt wird die SPE-Kartusche mit der analytischen Säule in Reihe geschaltet, und die Elution der Analyte von der SPE-Kartusche auf die analytische Säule beginnt. Wiederholungsversuche mit gleichem SPE-Material zeigen reproduzierbare Infusionschromatogramme. Das Profil der Infusionschromatogramme variiert stark und ändert sich in Abhängigkeit vom SPE-Material.

Abbildung 61 zeigt die Überlagerungen von Injektions- (rot) und Infusionschromatogrammen. Im Gegensatz zu Abbildung 60 entstanden alle Chromatogramme bei einer Analyse von Immunsuppressiva aus CDB mit einer MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Dualer-Kartuschen-Modus). Es können die Überlagerungen der entsprechenden Chromatogramme nach Aufreinigung über verschiedene Kombinationen an SPE-Materialien entnommen werden. Untersucht wurden folgende Kombinationen: 1.) HySphere C2 – Oasis[®] MCX, 2.) HySphere C8 EC-SE – Oasis[®] MCX, 3.) LiChrospher[®] ADS RP4 – Oasis[®] MCX und 4.) Oasis[®] HLB – Oasis[®] MCX. Das Injektionschromatogramm zeigt eine auf die Trennung von Ciclosporin A und D optimierte Elution einer Analytstandardlösung. Es entstehen vier Signale. Unter den gegebenen Bedingungen eluieren die Zielanalyte in folgender Reihenfolge: Tacrolimus und Ascomycin (1. Signal), Sirolimus, Everolimus und Desmethoxysirolimus (2. Signal, durch Degradierung der Substanzen ist hier noch ein weiteres kleines Signal zu sehen), Ciclosporin A (3. Signal) und Ciclosporin D (4. Signal). Alle Infusionschromato-

gramme zeigen einen „Schaltpeak“ bei 6,5min. Dieser entsteht aufgrund von Säulenschaltung. Zu diesem Zeitpunkt wird die 2. SPE-Kartusche mit der analytischen Säule in Reihe geschaltet. Danach beginnt die Elution der Analyte von der 2. SPE-Kartusche auf die analytische Säule. Wiederholungsversuche mit gleichen SPE-Materialien zeigen reproduzierbare Infusionschromatogramme. Die Profile der Infusionschromatogramme zeigen eine hohe Ähnlichkeit. Verglichen mit den Infusionschromatogrammen in Abbildung 60, weisen die Infusionschromatogramme in dieser Abbildung sehr viel mehr Stabilität auf. Die Unterschiede der Infusionschromatogramme verschiedener SPE-Materialkombinationen sind nicht mehr so gravierend. Auffällig ist der Abfall der Basislinie ab der 12. Minute. Stärkere Schwankungen der Basislinie sind auf zunehmende Verschmutzung der „Sample Cone“ im Massenspektrometer zurückzuführen.

Abbildung 62 zeigt die Ergebnisse einer Analyse von Immunsuppressiva aus CDB mit der entwickelten MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode im Triple-Kartuschen Modus. Dargestellt sind die Überlagerungen von Injektions- (rot) und Infusionschromatogrammen. Die Chromatogramme zeigen den kompletten Analysenzyklus. Untersucht wurden folgende Materialkombinationen: 1.) HySphere C2 – ProntoSil PLR – Oasis[®] MCX, 2.) HySphere C8 EC-SE – ProntoSil PLR – Oasis[®] MCX, 3.) LiChrospher[®] ADS RP4 – ProntoSil PLR – Oasis[®] MCX und 4.) Oasis[®] HLB – ProntoSil PLR – Oasis[®] MCX. Das Injektionschromatogramm zeigt eine auf die Trennung von Ciclosporin A und D optimierte Elution einer Analytstandardlösung. Wie in Abbildung 61 entstehen vier Signale. Unter den gegebenen Bedingungen eluieren die Zielanalyte in derselben Reihenfolge wie im Dualen-Kartuschen Modus. Alle Infusionschromatogramme zeigen einen „Schaltpeak“ bei 20min. Dieser entsteht aufgrund der Säulenschaltung. Zu diesem Zeitpunkt wird die 3. SPE-Kartusche mit der analytischen Säule in Reihe geschaltet. Danach beginnt die Elution der Analyte von der 3. SPE-Kartusche auf die analytische Säule. Alle Wiederholungsversuche mit gleichen SPE-Materialien zeigen reproduzierbare Infusionschromatogramme. Die Profile der Infusionschromatogramme verschiedener SPE-Materialkombinationen weisen eine sehr hohe Ähnlichkeit auf. Es sind keine Instabilitäten zu erkennen, die auf Ionisationseffekte hindeuten könnten.

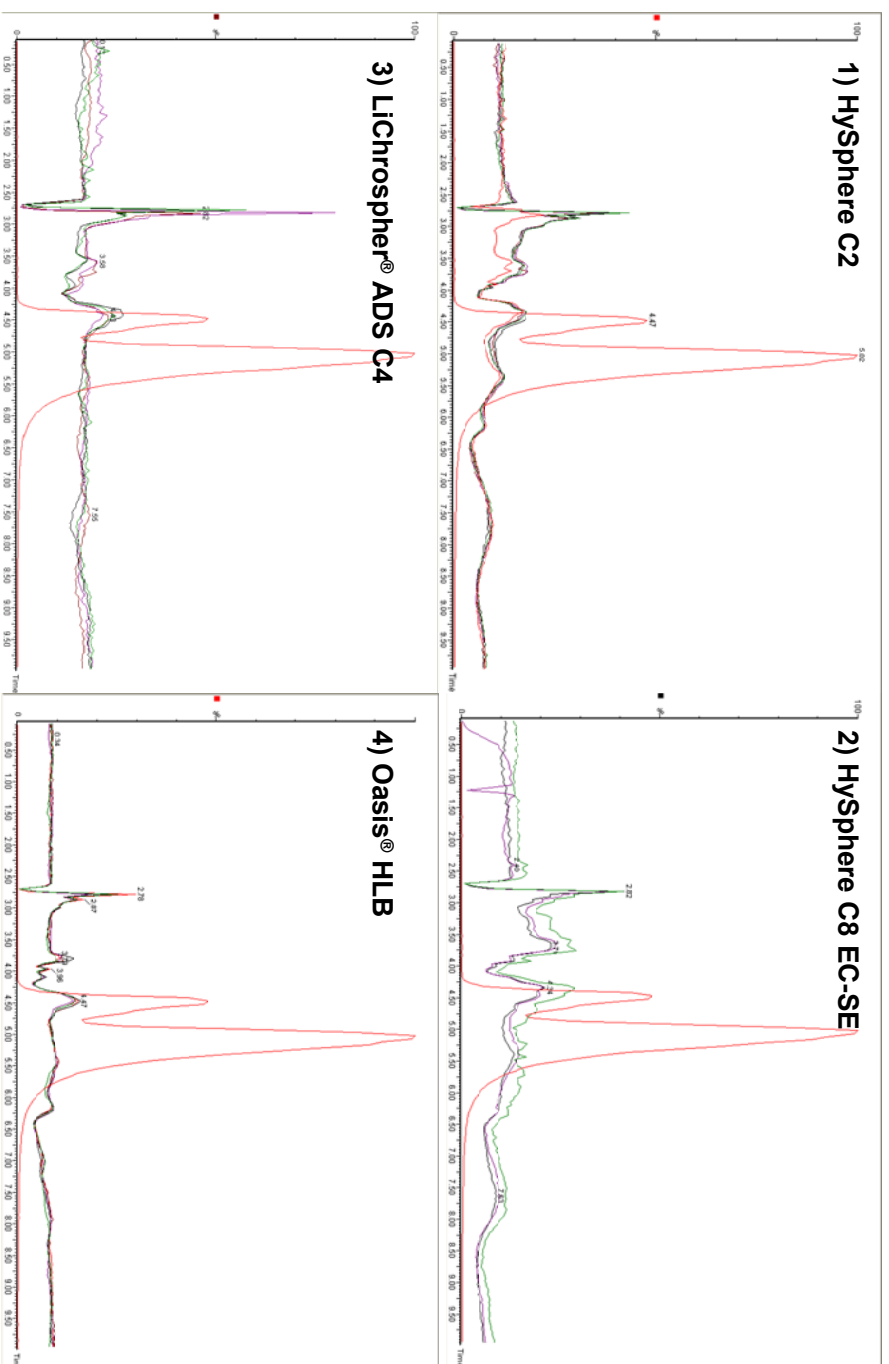


Abbildung 60: Nachweis von Matrixeffekten. Analyse von Immunsuppressiva aus CDB nach on-line Probenaufbereitung über eine konventionelle SPE-LC-MS/MS Methode (Single-Kartuschen Modus); Injektionschromatogramm (rot) wird jeweils von mehreren Infusionschromatogrammen überlagert; Probe: off-line CDB, prozessiert 16sec bei 75°C im Wasserbad; SPE-Kartuschen: 1) HySphere C2 (10x2mm), dp 7µm; 2) HySphere C8 EC-SE (10x2mm), dp 8µm; 3) LiChrospher® ADS RP4 (10x2mm), dp 25µm; 4) Oasis® HLB (10x2mm), dp 30µm (vollständige

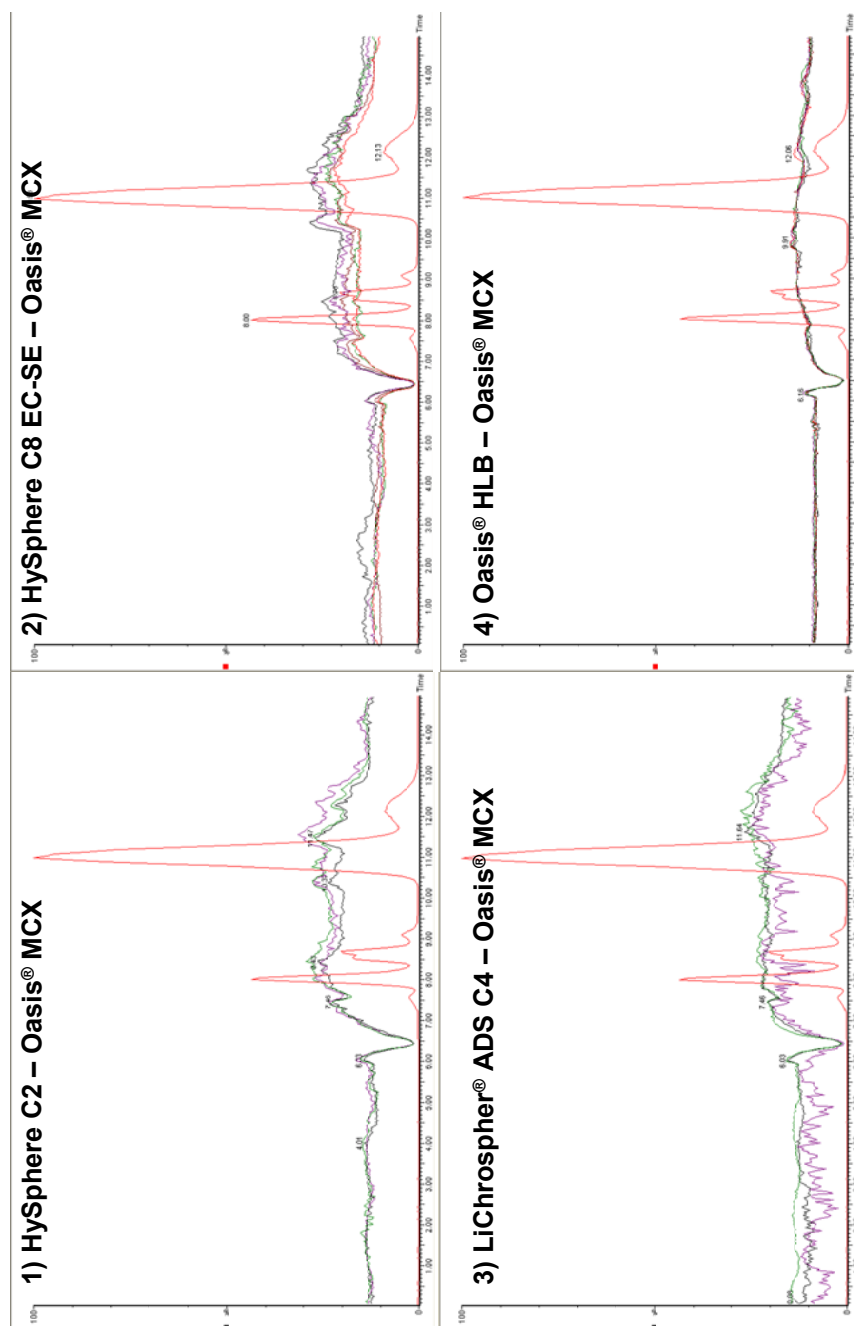


Abbildung 61: Nachweis von Matrixeffekten. Analyse von Immunsuppressiva aus CDB nach on-line Probenaufbereitung über eine MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Dualer-Kartuschen-Modus); Injektionschromatogramm (rot) wird jeweils von mehreren Infusionschromatogrammen überlagert; Probe: off-line CDB, prozessiert 16sec bei 75°C im Wasserbad; SPE-Kartuschen: 1) HySphere C2 (10x2mm), dp 7µm und Oasis® MCX, (10x1mm), dp 30µm; 2) HySphere C8 EC-SE (10x2mm), dp 8µm und Oasis® MCX (10x1mm), dp 30µm; 3) LiChrospher® ADS RP4 (10x2mm), dp 25µm und Oasis® MCX (10x1mm), dp 30µm 4) Oasis® HLB (10x2mm), dp 30µm und Oasis® MCX (10x1mm), dp 30µm (vollständige Parameter Analyse siehe Anhang 11).

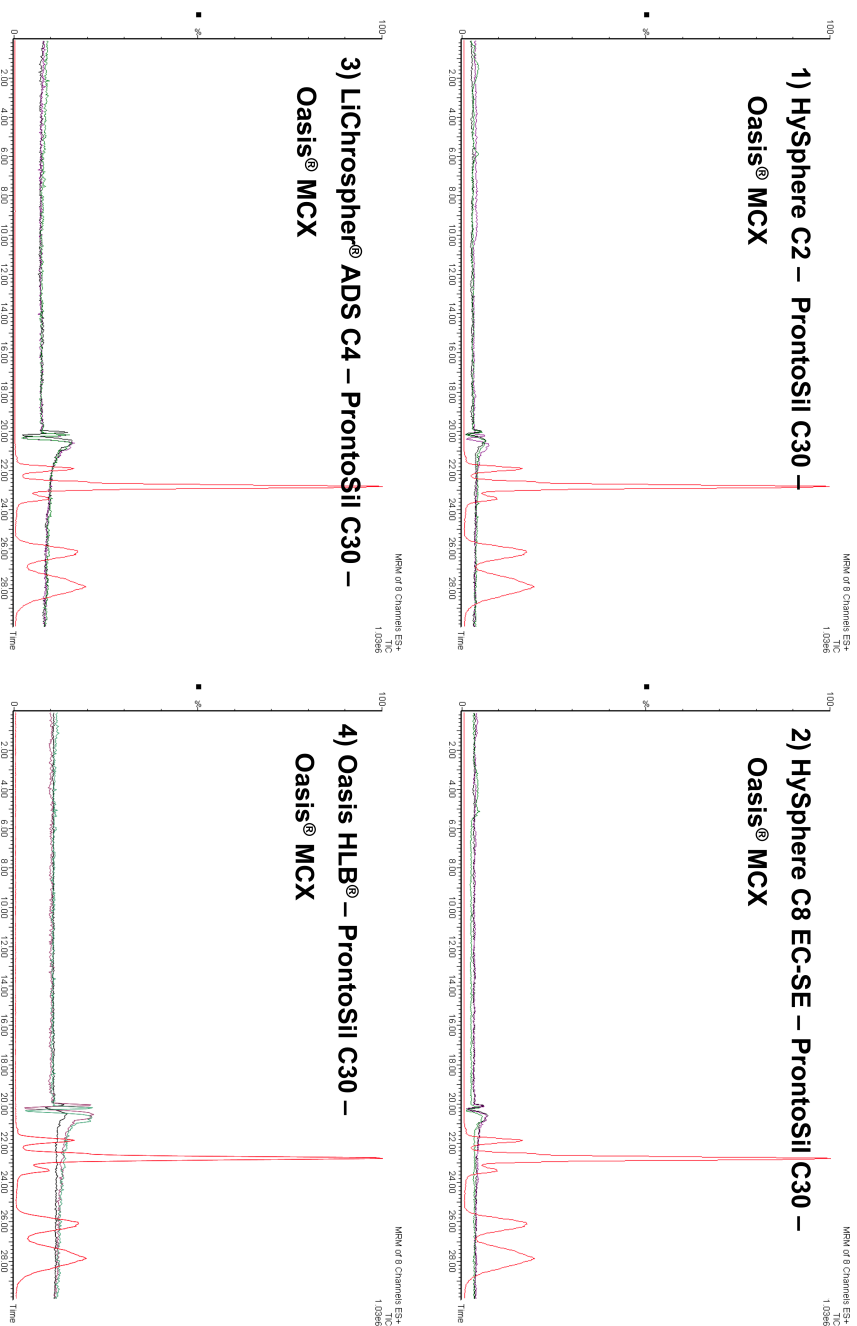


Abbildung 62: Nachweis von Matrixeffekten. Analyse von Immunsuppressiva aus CDB nach on-line Probenaufbereitung über eine MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Triple-Kartuschen Modus); Injektionschromatogramm (rot) wird jeweils von mehreren Infusionschromatogrammen überlagert; Probe: off-line CDB, prozessiert 10sec bei 75°C im Wasserbad; SPE-Kartuschen: 1) HySphere C2 (10x2mm), dp 7µm, ProntoSil PLR, (10x2mm) dp 25µm und Oasis® MCX (10x1mm), dp 30µm; 2) HySphere C8 EC-SE (10x2mm), dp 8µm, ProntoSil PLR (10x2mm), dp 25µm und Oasis® MCX (10x1mm), dp 30µm; 3) LiChrospher® ADS RP4 (10x2mm), dp 25µm, ProntoSil PLR (10x2mm), dp 25µm und Oasis® MCX (10x1mm), dp 30µm; 4) Oasis® HLB (10x2mm), dp 30µm, ProntoSil PLR (10x2mm), dp 25µm und Oasis® MCX (10x1mm) dp 30µm ID (vollständige Parameter Analyse siehe Anhang II).

Wie gezeigt, ist bei der Bestimmung von Matrixeffekten der biologischen Flüssigkeit CDB bei der Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut nach on-line Probenaufbereitung über eine konventionelle SPE-LC-MS/MS Methode (siehe Abbildung 60) festzustellen, dass es auf allen SPE-Materialien zu deutlichen Schwankungen der Intensität der Basislinie in den Infusionschromatogrammen kommt. Dies bedeutet, dass interferierende Matrixbestandteile bei der Probenaufbereitung über eine einzige SPE-Kartusche nur unzureichend abgereichert werden. Dabei werden Matrixbestandteile von den beiden HySphere-Materialien im Vergleich zu dem LiChrospher[®] ADS RP4- und dem Oasis HLB-Material schlechter abgereinigt. Eine Erklärung dafür ergibt sich aus dem Porendurchmesser der Materialien. Während die HySphere-Materialien einen durchschnittlichen Porendurchmesser von 140Å besitzen, weisen das LiChrospher[®] ADS RP4- und das Oasis[®] HLB-Material 60Å bzw. 81Å auf (vergleiche Kapitel 2.2.1.4). Das Serumalbumin-Molekül besitzt eine Größe von ca. 69 kDa und hat eine durchschnittliche Länge von 150Å [289]. Das Größenausschlussprinzip kommt daher stärker bei den beiden zuletzt genannten Materialien zum Tragen. In den HySphere-Materialien können sich somit Plasmaproteine während des Fraktionierungsschrittes einlagern, die beim folgenden Elutionsschritt mit auf die analytische Säule transferiert werden.

Bei der Bestimmung der Matrixeffekte wird über eine Spritzenpumpe kontinuierlich Standardlösung in das Eluat der analytischen Säule über ein T-Stück in den MS-Detektor gepumpt. Da die Standardlösung bei konstanter Rate ins MS geführt wird, sollte idealer Weise ein konstantes ESI-Signal detektiert werden. Dies ist auch der Fall, wenn eine Blank-Probe ohne Analyt injiziert wird. Kommt es durch Injektion einer biologischen Matrixprobe (beispielsweise CDB) in der Quelle des Massenspektrometers jedoch zu Ionisationseffekten, wird dies durch veränderte Intensität der Basislinie detektiert. In den meisten Fällen tritt eine Ionensuppression, abhängig von Substanz und Aufbereitungsmethode, nach dem Totvolumen auf [6]. Dies konnte mit der Bestimmung der Matrixeffekte der biologischen Flüssigkeit CDB bei der Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut nach on-line Probenaufbereitung über eine konventionelle SPE-LC-MS/MS Methode nachgewiesen werden.

Mit der MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode im Dualen-Kartuschen Modus (siehe Abbildung 61) konnte ein Teilergebn erzielt werden. Die Analyse von Immunsuppressiva aus CDB nach on-line Probenaufbereitung über zwei SPE-Kartuschen unterliegt nachweislich weniger Matrixeffekten als dieselbe Analyse mit nur einer konventionellen SPE-Kartusche (Single-

Kartuschen Modus). Mit allen untersuchten SPE-Materialkombinationen konnten Infusionschromatogramme aufgenommen werden, die deutlich stabilere Basislinien zeigen. Daraus ist zu abzuleiten, dass interferierende Matrixbestandteile über zwei SPE-Kartuschen mit unterschiedlichen Retentionsmechanismen besser abgereichert werden als auf einer SPE-Kartusche. Dies ist auf die höhere Anzahl an chromatographischen Retentionsmechanismen zurückzuführen. Bei den vorliegenden Chromatogrammen ist es schwierig, die Abweichungen der Infusionsprofile den unterschiedlichen SPE-Materialien zuzuordnen. Es ist davon auszugehen, dass die Verwendung der Materialien LiChrospher[®] ADS RP4 und Oasis[®] HLB leichte Vorteile mit sich bringen. Diese Materialien besitzen bereits selbst mehrere chromatographische Dimensionen (siehe Tabelle 18). Bei den Infusionschromatogrammen kann es aufgrund von anderen Lösemittelzusammensetzungen nach dem Injektionspeak zu einer leicht erhöhten Basislinie kommen. Daher ist der Abfall der Basislinie nach der 12. Minute schwer zu interpretieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass dies ebenfalls eine Ionensuppression ist, die durch hydrophobe Matrixsubstanzen hervorgerufen wird. Hydrophobe Matrixsubstanzen können jederzeit von der analytischen Säule eluieren. Sie können daher auch zu einem späteren Zeitpunkt der Analyse oder erst im nächsten Lauf Ionensuppressionen hervorrufen [137]. Durch Erweiterung der MRM-Methode des Massenspektrometers auf einen für (Phospho-)Lipide spezifischen Massenübergang (m/z 184 \rightarrow m/z 184) konnte gezeigt werden, dass es genau zu der Zeit des Basislinienabfalls in Abbildung 61 zu einem massiven Signal in der (Phospho-)Lipidspur kommt. Es wird daher angenommen, dass diese (Phospho-)Lipide starken Einfluss auf den Ionisationsprozess der Analyte in diesem Zeitfenster haben und Ionensuppression hervorrufen. Aus diesem Grund sollten (Phospho-)Lipide ebenfalls bei der Probenaufbereitung eliminiert werden.

Das Erreichen aller im Vorfeld definierten Ziele bezüglich des Nachweises einer ungestörten Analyse der Immunsuppressiva aus CDB, konnte mit der MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode im Triple-Kartuschen Modus (siehe Abbildung 62) nachgewiesen werden. Die Analyse von Immunsuppressiva aus CDB nach on-line Probenaufbereitung über drei unterschiedliche SPE-Kartuschen unterliegt nachweislich keinen Matrixeffekten. Mit allen untersuchten SPE-Materialkombinationen konnten Infusionschromatogramme aufgenommen werden, die absolut stabile Basislinien zeigen. Daraus ist zu entnehmen, dass interferierende Matrixbestandteile über die drei getesteten SPE-Kartuschen mit unterschiedlichen Retentions-

mechanismen rückstandsfrei abgereichert werden. Dies ist auf die hohe Anzahl an unterschiedlichen chromatographischen Retentionsmechanismen zurückzuführen. Aus den vorliegenden Chromatogrammen sind keine Unterschiede der Infusionsprofile in Abhängigkeit von den SPE-Materialkombinationen zu entnehmen. Dennoch ist davon auszugehen, dass die Verwendung der Materialien LiChrospher® ADS RP4 und Oasis® HLB leichte Vorteile mit sich bringen. Diese Materialien besitzen bereits selbst mehrere chromatographische Dimensionen (siehe Tabelle 18). Diese Vermutung wird gesondert untersucht (siehe Kapitel 3.4.5). Die Reihenfolge der SPE-Materialien wurde bewusst gewählt. Die (Phospho-)Lipide sollten so früh wie möglich in der Analyse eliminiert werden. Eine Eliminierung auf der ersten SPE-Kartusche ist aufgrund des hohen organischen Anteils in der mobilen Phase, der zur Elution der Analyte benötigt wird, nicht möglich. Proteine würden mit dem hohen Anteil an organischem Lösemittel in der mobilen Phase präzipitieren. Daher muß als erster SPE-Aufreinigungsschritt eine Eliminierung von makromolekularen Matrixbestandteilen wie beispielsweise Proteine und anderer zellulärer Bestandteile stattfinden. Eine Eliminierung der (Phospho-)Lipide im dritten SPE-Aufreinigungsschritt erscheint wenig sinnvoll, da in diesem Fall das Oasis® MCX-Material als zweites Aufreinigungsmaterial genutzt werden würde. Es besitzt jedoch u.a. einen hydrophilen-lipophilen Interaktionsmechanismus. Es ist anzunehmen, dass die (Phospho-)Lipide auf diesem Material extrahiert werden und die anschließende Elution unkontrolliert verläuft. Diese Überlegung stimmt mit der Vermutung von Shen et al. überein. Diese Autoren gehen aufgrund ihrer Ergebnisse davon aus, dass die tertiäre Struktur eines Phospholipids im wässrigen Medium vorzugsweise mit hydrophoben Strukturen Wechselwirkungen eingeht. Deswegen sollten „mixed-mode“-Phasen bei der Aufreinigung von biologischen Flüssigkeiten vermieden werden, wenn in der Umkehrphasenchromatographie spät eluierende Phospholipide als Grund für Ionensuppression anzunehmen sind [136]. Wird das Oasis® MCX-Material aber als drittes Aufreinigungsmaterial genutzt, werden keine spät eluierenden (Phospho-)Lipide mehr erwartet. Das Material kann somit den Teil an hydrophoben Matrixbestandteilen abreichern, der dem ersten Aufreinigungsmaterial entgangen ist. Des Weiteren wird eine Probe von hydrophilen neutralen bis anionischen Substanzen befreit.

Trotz der Elimination der Matrixeffekte wird der Gebrauch der Internen Standards als Indikator für Analytverlust während der Methode beibehalten. Die wird auch von Van Eckhaut et al. empfohlen [266].

3.4.5 Untersuchungen an interferierenden (Phospho-)Lipiden in der CDB-Matrix und zu deren Entfernung

In diesem Kapitel werden eingehende Untersuchungen bezüglich des Nachweises und der Elimination von interferierenden (Phospho-)Lipiden beschrieben. Als erstes erfolgte ein Beweis dafür, dass es sich bei den interferierenden Substanzen aus der CDB-Matrix bei der Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut um Phospholipide handelt (siehe Kapitel 3.3). Im Anschluss daran werden Ergebnisse von Untersuchungen verschiedener Verfahren zur Eliminierung von Phospholipiden dargestellt. Abschließend wird die Möglichkeit einer on-line Anwendung diskutiert.

Für den Beweis wurde, beispielhaft für alle Phospholipide, eine methanolische Lösung von DL-alpha-Phosphatidylcholin (diastearoyl) in den Tandemmassenspektrometer injiziert und direkt detektiert. Die Detektion erfolgte mit der gemeinsamen MRM-Methode für Immunsuppressiva und Phospholipide (siehe Kapitel 3.4.5).

Abbildung 63 zeigt die Aufspaltung eines Totalen Ionenchromatogramms in die einzelnen Massenspuren der Immunsuppressiva und der Phospholipide. Die Spuren aller Analyte zeigen ruhige Basislinien ohne relevante Signale. Die vorletzte Spur repräsentiert die Phospholipide. Es wird ein großes Signal zwischen 0,4-2 Minuten detektiert. Verglichen mit den Spuren der Immunsuppressiva ist dieses Signal ca. 1.000-fach so groß. In der letzten Spur ist das Totale Ionenchromatogramm (TIC) zu sehen. Es wird deutlich, dass das einzig signifikante Signal nur aus dem injizierten Phosphatidylcholin resultiert.

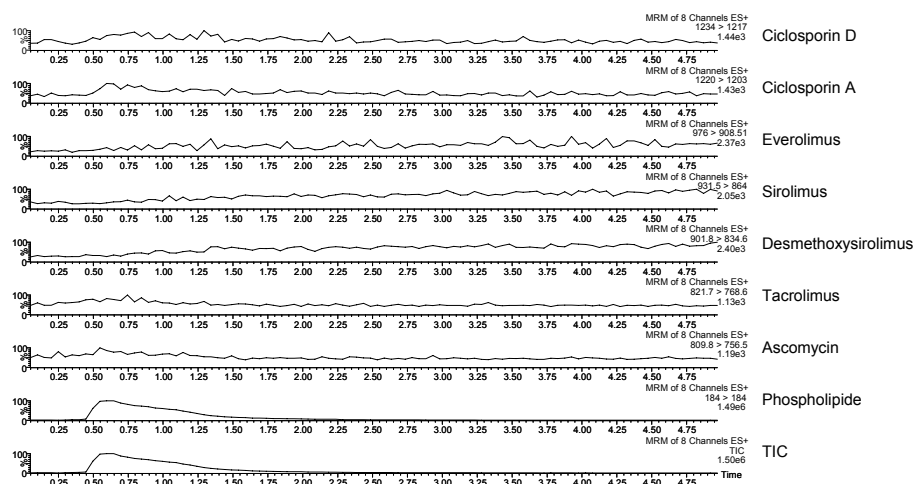


Abbildung 63: Untersuchungen zu interferierenden Substanzen in der CDB-Matrix. Probe: methanolische Lösung von DL-alpha-Phosphatidylcholin (diastearoyl); Konzentration 2,5µg/mL; Injektionsvolumen: 25µL; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumformiat (80/20, v/v) + 1% Ameisensäure; Flussrate: 1,0mL/min; MS-Detektion: MRM aller Analyte und der Internen Standards plus MRM m/z 184→m/z 184;

Die Untersuchungen erfolgten beispielhaft an einem Phosphatidylcholin. Wie schon in Tabelle 3 gezeigt, bilden Phosphatidylcholin mengenmäßig, sowohl im Plasma als auch in den Erythrozyten, den größten Anteil an Phospholipiden. Es wurde nachgewiesen, dass aus dieser Substanz mit Hilfe der „in-source collisionally induced dissoziation“-Methode ein Fragment entsteht, das beim Massenübergang $m/z\ 184 \rightarrow 184$ detektiert werden kann. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um das Trimethylammoniummethylphosphation [141].

Die Eliminierung eines großen Anteils interferierender (Phospho-)Lipide bei der Analyse von Immunsuppressiva aus CDB wurde bereits in Kapitel 3.3.3.2 dargestellt. Bei der in diesem Kapitel beschriebenen Abreicherung von (Phospho-)Lipiden handelt es sich um ein Verfahren, das speziell im Zusammenhang mit den untersuchten Modellanalyten entwickelt wurde. Es basiert auf dem unterschiedlichen Retentionsverhalten der (Phospho-)Lipide und der Modell-analyte auf einer stationären Phase, das dem Prinzip der molekularen Formerkennung zugrunde liegt.

Für die Abreicherung von Phospholipiden in einem on-line Analysensystem müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Bindungsvermögen des Materials gegenüber Phospholipide unter bestimmten Voraussetzungen (Zusammensetzung und pH-Wert der mobilen Phase).
- On-line Verwendung, d.h., es muß unter gewissen Voraussetzungen möglich sein, eine Trennung der Analyte von den Phospholipiden zu erreichen (Zusammensetzung und pH-Wert der mobilen Phase).
- Regenerationpotential, d.h., vollständige Elution der retenierten Phospholipide unter veränderten Bedingungen (Zusammensetzung und pH-Wert der mobilen Phase).

Ein erstes Resultat konnte durch die Ermittlung eines Lösemittels erzielt werden, mit dem die Bindung des Phospholipids (DL-alpha-Phosphatidylcholins, diastearoyl) an das Hybrid SPE™ Material gezeigt werden konnte. Mit der mobilen Phase [Methanol/10mmol Ammoniumformiat, pH = 2,8 (20/80, v/v)] (entspricht einem Zusatz von 2% Ameisensäure) erfolgt eine Retention des Phospholipids. Das Fraktionierungsvolumen (V_F) des Phospholipids kann, wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, berechnet werden. Es beträgt >10mL. Ferner ermöglichte reines Methanol die vollständige Elution des vorher retenierten Phospholipids von dem Material.

Unter den beschriebenen Retentionsbedingungen eluiert eine Standardlösung der Analyte innerhalb der ersten 1,5 Milliliter. Dies entspricht einem Durchbruchsvolumen (V_B) von 1,5mL. Es ist darauf hinzuweisen dass bei diesem Abreicherungsverfahren für Phospholipide $V_B < V_F$ erwünscht ist. Damit kann dieses Packungsmaterial zur on-line SPE verwendet werden. Weitere Untersuchungen hierzu erfordern das Vorliegen des Materials im Kartuschenformat. Dieses stand jedoch nicht zur Verfügung.

3.4.6 Bestimmung der Zusammensetzung der nach on-line SPE-Aufbereitung verbleibenden CDB-Matrix

Die Bestimmung der Zusammensetzung der nach on-line Aufbereitung verbleibenden, d.h. nicht angereicherten CDB-Matrix erfolgte über die Aufnahme von MS-Scans. Dafür wird das Kollisionsgas ausgeschaltet und der Massenbereich m/z 100-1.000 während der 10-minütigen Separationszeit einer Analyse mehrfach gescannt. Ein solcher MS-Scan gibt Aufschluss

darüber, mit welcher Intensität bestimmte Massen zu welchem Zeitpunkt detektiert werden. Dabei zeigt das Totale Ionen Chromatogramm (TIC) der Scans das Elutionsprofil restlicher Substanzen. Die Intensität des TIC's repräsentiert dabei das Ausmaß an Restmatrixsubstanzen im Eluat. Darüber hinaus geben sämtliche einzelne MS-Scans, die in kurzen regelmäßigen Zeitabständen aufgenommen werden, Auskunft über die Massen der zu einem bestimmten Zeitpunkt eluierenden Substanzen.

Die verbleibende CDB Matrix wird vergleichend nach on-line Probenaufbereitung über verschiedene Plattformen untersucht. Darüber hinaus wurde der Aufreinigungseffekt verschiedener SPE-Materialkombinationen der MD-SPE-POPLC Methode (Triple-Kartuschen Modus) untersucht.

3.4.6.1 Probenaufbereitung und Trennung über verschiedene Plattformen.

Bei dieser Untersuchung wird die MD-SPE-POPLC Methode (Triple-Kartuschen Modus) mit einer konventionellen SPE-LC Methode (Single-Kartuschen Modus) verglichen. Die genauen Parameter dieser Methode sind in und Anhang 11 aufgeführt. Als Referenz dient eine Analytstandardlösung.

Abbildung 64 zeigt die Untersuchungsergebnisse auf einer konventionellen SPE-LC Plattform. Im oberen linken Chromatogramm ist das Totale Ionenchromatogramm (TIC) des MS-Scans während der 10-minütigen Elutionsphase einer CDB-Analyse zu sehen. Dem Chromatogramm ist zu entnehmen, dass es zwischen 3,5 bis 5,5 Minuten zur verstärkten Elution von Matrixsubstanzen kommt. Im unteren linken Injektionschromatogramm wird das Totale Ionenchromatogramm einer Standardlösung auf derselben Plattform gezeigt. Zu erkennen ist ein ausgeprägtes Signal zwischen 4 bis 5 Minuten. Das Spektrum im rechten Teil der Abbildung repräsentiert den MS-Scan (Momentaufnahme) zum Zeitpunkt 4,3 Minuten (gestrichelte Linie in den TIC's des MS-Scans von CDBs und des Injektionschromatogramms der Standardlösung). Es zeigt vermehrt eluierende Massen über den komplett gescannten Massenbereich von m/z 100-1000.

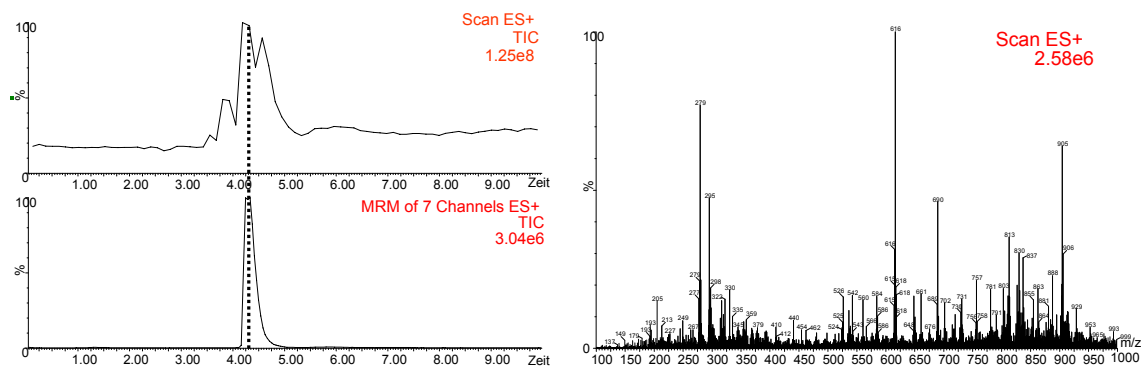


Abbildung 64: Untersuchung auf Restmatrixsubstanzen. CDB-Probe nach Aufbereitung und Trennung mit dem konventionellen SPE-LC-MS/MS System; oben links: TIC MS-Scan einer dotierten CDB-Probe, rechts: MS-Scan bei 4,3 Minuten, links unten (zum Vergleich): TIC einer normalen Analyse einer Standardlösung; SPE-Kartusche: Oasis[®] HLB (10x2mm), dp 30µm; Dotierung: alle Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards in 2,5vol.% DMSO (Konzentration je Analyt: 100ng/mL); Injektionsvolumen: 25µL; MS-Detektion: MRM aller Analyte und der Internen Standards plus MRM m/z 184→m/z 184 (vollständige Parameter siehe).

Bei diesem System ist von Nachteil, dass die Elution der Analyte im gleichen Zeitraum stattfindet, in dem auch zahlreiche Matrixsubstanzen eluieren. Befinden sich Analyt und Matrix in einer Probe, wie beispielsweise in einer Patientenprobe, so können die Matrixsubstanzen die Ionisation der Analyte stark beeinträchtigen. Im Spektrum können vereinzelt Massen den Analyten zugeordnet werden. So verbirgt sich unter der Masse m/z 813 beispielsweise das Natriumaddukt von Ascomycin. Darüber hinaus ist das Ammoniumaddukt mit einer Masse von m/z 809 enthalten (nicht extra beschriftet). Unter der Masse m/z 906 verbirgt sich das Natriumaddukt von Desmethoxysirolimus.

In Abbildung 65 sind die Ergebnisse der Analyse von CDB auf Restmatrixsubstanzen auf einer MD-SPE-POPLC Plattform im Triple-Kartuschen Modus zu entnehmen. Im oberen linken Chromatogramm ist das Totale Ionenchromatogramm des MS-Scans während der 10-minütigen Elutionsphase abgebildet. Kurz nach dem Schaltpeak (0,5 Minuten) bis ca. 2 Minuten eluieren noch einige wenige Restmatrixsubstanzen. Im unteren linken Injektionschromatogramm ist das TIC einer Standardlösung auf derselben Plattform gezeigt. Zu erkennen sind vier gut voneinander getrennte Signale zwischen 2 bis 8 Minuten (der kleine Peak neben dem zweiten Peak entsteht aufgrund der Spaltprodukte des Desmethoxysirolimus). Das Spektrum im rechten Teil der Abbildung repräsentiert den

MS-Scan zum Zeitpunkt von 1,7 Minuten (gestrichelte Linie in den TIC des MS-Scans von CDB und des Injektionschromatogramms der Standardlösung). Er zeigt restliche eluierende Massen hauptsächlich im Massenbereich von m/z 200-500.

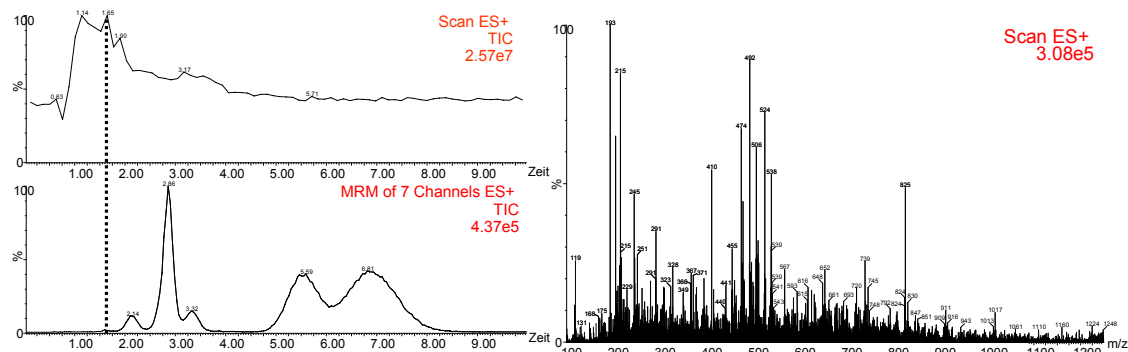


Abbildung 65: Untersuchung auf Restmatrixsubstanzen. CDB-Probe nach Aufbereitung und Trennung mit dem MD-SPE-POPLC-MS/MS System im Triple-Kartuschen Modus; oben links: TIC MS-Scan einer dotierten CDB-Probe, rechts: MS-Scan bei 1,7 Minuten, links unten (zum Vergleich): TIC einer normalen Analyse einer Standardlösung; SPE-Kartuschen: LiChrospher® ADS RP4 (10x2mm), dp 25µm, ProntoSil PLR (10x2mm), dp 25µm und Oasis® MCX (10x1mm); Dosierung: alle Immunsuppressiva inklusive der Internen Standards in 2,5vol.% DMSO (Konzentration je Analyt: 100ng/mL); Injektionsvolumen: 25µL; MS-Detektion: MRM aller Analyte und der Internen Standards plus MRM m/z 184→ m/z 184 (vollständige Parameter siehe Anhang 11).

Hier können keine Analyten identifiziert werden, da diese erst zu einem späteren Zeitpunkt eluieren.

Besonders hervorzuheben ist, dass die Signalintensität des Totalen Ionenchromatogramms der Matrixprobe und auch die des MS-Scans auf der MD-SPE-POPLC-MS/MS Plattform (Triple-Kartuschen Modus) sehr viel geringer sind. Sie zeigen Signalintensitäten von $2,6 \cdot 10^7$ und $3,1 \cdot 10^5$. Im Vergleich dazu werden Signalintensitäten von $1,3 \cdot 10^8$ und $2,6 \cdot 10^6$ auf der konventionellen SPE-LC-MS/MS Plattform erhalten. Diese Verunreinigungen sind um eine Zehnerpotenz höher. Daraus ist zu folgern, dass eine CDB-Probe auf einer MD-SPE-POPLC-MS/MS Plattform im Triple-Kartuschen Modus sehr viel besser aufgereinigt wird als auf einer konventionellen SPE-LC-MS/MS Plattform. Die Probe enthält nur noch ein Zehntel an Restmatrixsubstanzen im Vergleich zur konventionellen Plattform. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass das System, vor allem aber der empfindliche Detektor, weniger kontaminiert wird. So müssen auch weniger Reinigungsschritte durchgeführt werden.

Während auf einer konventionellen SPE-LC-MS/MS Plattform viele undefinierte Matrixsubstanzen eluieren, können bei einer MS-SPE-POPLC-MS/MS Plattform bereits störende Gruppen identifiziert werden. Nach Bennett et al. konnten einige Massen mit hoher Wahrscheinlichkeit bestimmten Substanzen zugeordnet werden [290]. So kann ein Hauptionencluster, m/z 492 dem Monomer von Lysophosphatidylcholin (16:0) zugeordnet werden. Weiterhin beträgt das Masse-zu-Ladungsverhältnis von Lysophosphatidylcholin (18:2) m/z 520 und das Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z 524 kann dem Lysophosphatidylcholin (18:0) zugeordnet werden. Unter der Masse m/z 476 verbirgt sich das demethylierte quarternäre Amin der Cholingruppe [M-15]. Für eine C-16 gesättigte Fettsäureseitenkette vom Lysophosphatidylcholin beträgt das Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z 251.

3.4.6.2 Probenaufbereitung über verschiedene SPE-Packungsmaterialien und MD-SPE-POPLC Methode (Triple-Kartuschen Modus)

Bei dieser Untersuchung wurden verschiedene SPE-Materialkombinationen für die in dieser Arbeit entwickelte MD-SPE-POPLC Methode (Triple-Kartuschen Modus) auf ihren Aufreinigungseffekt geprüft. Folgende SPE-Materialkombinationen unterlagen der Analyse: 1.) HySphere C2 – ProntoSil PLR – Oasis[®] MCX, 2.) HySphere C8 EC-SE – ProntoSil PLR – Oasis[®] MCX, 3.) LiChrospher[®] ADS RP4 – ProntoSil PLR – Oasis[®] MCX und 4.) Oasis[®] HLB – ProntoSil PLR – Oasis[®] MCX. Anzumerken ist, dass hierbei nur das Material der ersten Kartusche variiert wurde. Eine Standardlösung der Analyte diente als Referenz.

Abbildung 66 zeigt vergleichend die Ergebnisse der Bestimmung der Restmatrixsubstanzen einer CDB-Probe nach Aufreinigung mit einer MD-SPE-POPLC-MS/MS Plattform im Triple-Kartuschen Modus. Abgebildet sind jeweils das Totale Ionenchromatogramm im oberen Teil und ein Spektrum im unteren Teil. Das Spektrum stellt ein Ausschnitt zu dem Zeitpunkt dar, an dem der größte Anteil an Matrixsubstanzen eluiert (4,5 Minuten; der Start der Aufnahme des Spektrums entspricht nicht dem Start des Trennungsvorganges. Er liegt bei ca. 2,8 Minuten).

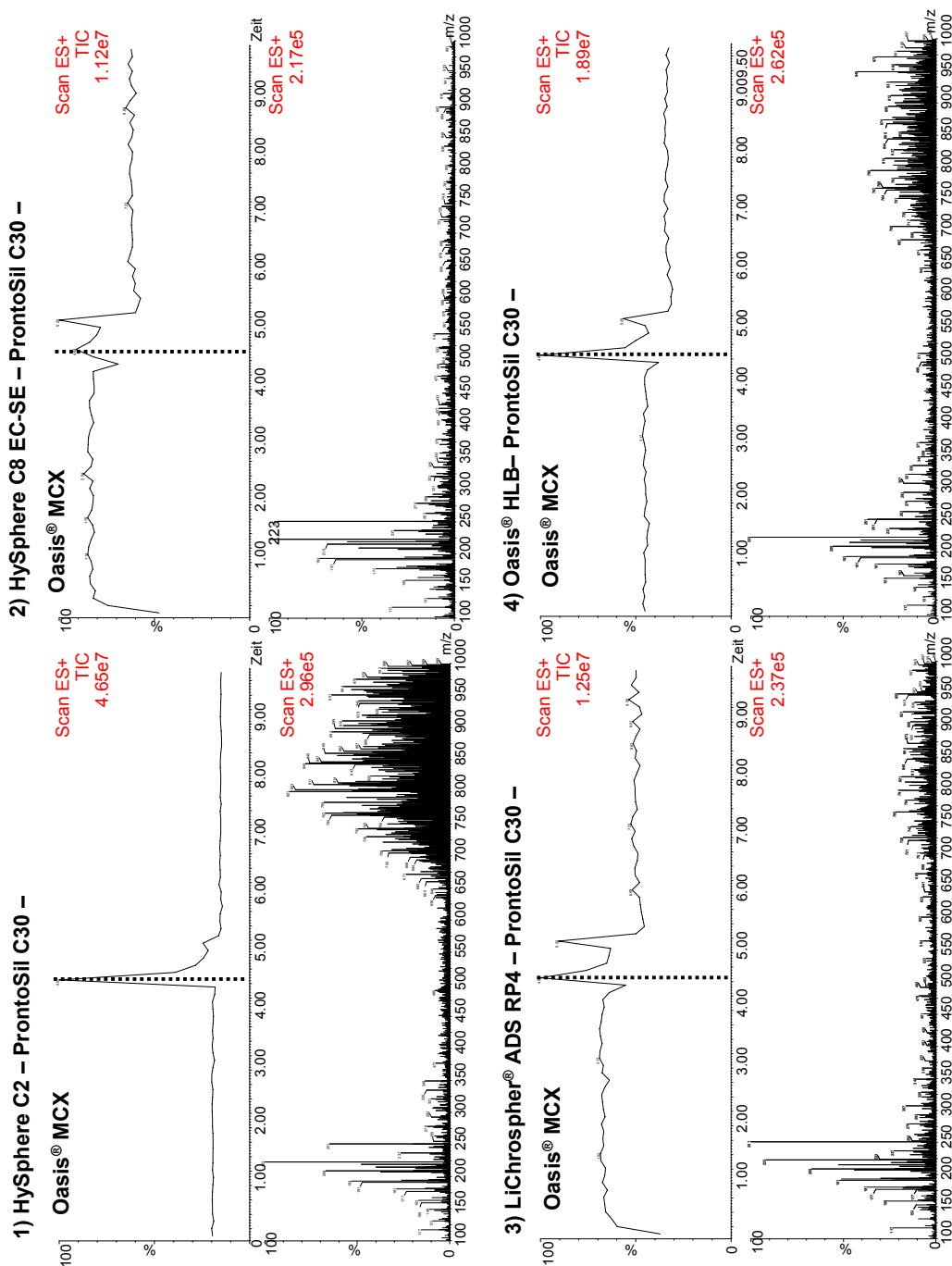


Abbildung 66: Untersuchung auf Restmatrixsubstanzen. Off-line hergestellte CDB-Probe nach Aufbereitung und Trennung mit dem MD-SPE-POPLC-MS/MS System im Triple-Kartuschen Modus; SPE-Materialkombinationen: 1) HySphere C2 – ProntoSil PLR – Oasis® MCX, 2) HySphere C8 EC-SE – ProntoSil PLR – Oasis® MCX, 3) LiChrospher® ADS RP4 – ProntoSil PLR – Oasis® MCX und 4) Oasis® HLB – ProntoSil PLR – Oasis® MCX. (vollständige Parameter siehe Anhang 11).

Die erste Kombination mit einer HySphere C2-Kartusche als erstes SPE-Aufreinigungsmaterial zeigt mit Abstand die höchsten Intensitäten, sowohl im Totalen Ionenchromatogramm als auch im Spektrum. Hier eluieren zum Zeitpunkt 4,5 Minuten noch sehr viele Substanzen. Dies wird an dem ausgeprägten Signal zu diesem Zeitpunkt im TIC deutlich. Das Spektrum gibt darüber Auskunft, dass hier Substanzen eluieren, die relativ hohe Massen aufweisen (m/z 650-1.000). Tendenziell weist die Kombination mit Oasis[®] HLB als erste SPE-Kartusche ähnliche Aufreinigungscharakteristika auf. Die Kombinationen mit einer LiChrospher[®] ADS RP4- und HySphere C8 EC-SE-Kartusche dagegen besitzen TIC's in denen keine auffälligen Signale zu sehen sind. Bei 4,5 Minuten zeigen auch die dazugehörigen Spektren nur noch niedermolekulare Substanzen mit Massen m/z 100-250.

Es konnte gezeigt werden, dass die besten Ergebnisse in Bezug auf die Aufreinigung der CDB-Matrix mit dem LiChrospher[®] ADS RP4- und dem HySphere C8 EC-SE-Material als erstem SPE-Aufreinigungsschritt, erzielt werden konnten. Weiterer Vorteil des LiChrospher[®] ADS RP4-Materials ist der größere Partikeldurchmesser. Im Gegensatz zum HySphere Material eignet es sich somit besser für die Aufreinigung von viskösen Flüssigkeiten wie beispielsweise CDB.

3.5 Entwicklung einer Methodik zur Reinigung der Prozessierungseinheit und der Kapillaren der Analysenplattform

Die Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten MD-SPE-POPLC-MS/MS Verfahrens zur direkten und vollständigen Analyse einer Reihe von Immunsuppressiva aus Vollblut erfordert auch eine Reinigung der Analysenplattform. Der Grund hierfür sind Ablagerungen von Proteinen und Lipiden an den Kapillarwänden und an den Ventilen nach Mehrfachinjektionen bzw. einem kontinuierlichen Betrieb. Um Reste von Lyseagenzien, Zellrückstände und Blutproteine aus den Leitungssystemen zu entfernen, wird in Blutanalysengeräten häufig eine 5%ige Hypochloritlösung zur Reinigung verwendet [291]. Diese soll alle 500 Zyklen bzw.

einmal am Tag eingespült werden [292]. Nachteilig bei der Verwendung von Hypochloritlösung ist, dass es durch die Bildung von Chlor aggressiv ist und so das Kapillar- und Ventilmaterial angreift.

3.5.1 Ermittlung eines effizienten Reinigungsreagenzes

In diesem Kapitel wird die Ermittlung eines effizienten Reinigungsreagenzes beschrieben. Die Qualität eines Reinigungsreagenzes wurde hinsichtlich folgender Anforderungen evaluiert:

- Lösungsvermögen (Solubilisierung) von Hitze-denaturiertem Vollblut,
- Kompatibilität mit den Materialien des Systems,
- Beeinflussung der massenspektrometrischen Detektion und
- Detektionsmöglichkeit der Reinigungseffizienz.

Um ein geeignetes Reinigungsreagenz zu ermitteln, wurden die experimentellen Ergebnisse mit folgenden Proteinbestimmungsverfahren verglichen: Lowry-Proteinbestimmung, Coomassie Plus-Proteinbestimmung und BCA-Proteinbestimmung [293-297].

Vergleichskriterien:

- Lösungsvermögen (Solubilisierung) von Hitze-denaturiertem Vollblut

Es sollte die Auflösung des sich bildenden „Biofilms“ in der beheizten Edelstahlkapillare und in den Kapillaren des Analysengerätes erreicht werden. Dafür wurden Glaskapillaren mit Vollblut gefüllt und mit einem Versiegelungskit verschlossen. Anschließend erfolgte die Prozessierung der Probe für 35sec bei 75°C im Wasserbad. Nach den von Milojković bestimmten Parametern liegen diese Bedingungen über der Gelbildungsgrenze [7]. Die sich bildende Blutrückstände werden aus den Kapillaren gedrückt und in die entsprechenden Reinigungsreagenzien gegeben. Das Auflösungsvermögen wird visuell bestimmt.

- Reinigungseffizienz

Für dieses Experiment wurde das System mit 200 Prozessierungszyklen von jeweils 25 µL Vollblut belastet. Während der Reinigung des Analysensystems erfolgt die Aufnahme der Absorption der Reinigungslösung mit Hilfe eines UV-Detektors. Der zeitliche Abfall des Rückdrucks bestimmt dabei die Reinigungseffizienz.

- Materialverträglichkeit der Reagenzien

Die Auswahl des Reinigungsreagenzes erfolgte unter Berücksichtigung der Kompatibilität mit den Materialien des Systems. Das Reinigungsreagenz darf die Edelstahlkapillare der Prozessierungseinheit, die Kapillaren und die Ventile nicht angreifen. Besondere Wichtigkeit bei der Auswahl des Reinigungsreagenzes wurde dabei der Kompatibilität mit einer massenspektrometrischen Detektion zugeschrieben.

- Präzipitation

Ein entscheidendes Kriterium bei der Auswahl der Reinigungslösung ist, dass diese zu keiner Präzipitation führt.

- Detektionsvermögen

Um den Reinigungsprozess zu verfolgen, ist die Reaktion des Reagenzes mit Proteinen mit Hilfe eines UV/VIS-Detektors zu messen.

- Linearitätsbereich

Die Detektion des Reinigungsprozesses sollte über einen möglichst großen Linearitätsbereich möglich sein.

Die Untersuchungsergebnisse dazu sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Evaluation verschiedener Reinigungsreagenzien.

| | BCA-Proteinbestimmung | Coomassie Plus-Proteinbestimmung | Lowry-Proteinbestimmung |
|---|--|---|---|
| pH-Wert | basisch | sauer | basisch |
| Detektionswellenlänge [nm] | 562 | 595 | 750 (500) |
| Reinigungseffizienz (i.e. Aflösungsvermögen von erhitztem denaturiertem Vollblut "Biofilm") | gut | schlecht | gut |
| Verminderung des Rückdrucks im System | effizient | ineffizient | effizient |
| Materialverträglichkeit | verträglich | greift Edelstahlkapillaren an | verträglich |
| Linearitätsbereich [μg Albumin/mL] | 0 - 2.000 | 1 - 1.500 | 1 - 1.500 |
| Detektionsvermögen | Reinigung und Detektion in einem Schritt | Detektion möglich | zweites Reagenz zur Detektion notwendig |
| Präzipitation | keine | Proteinpräzipitation | keine |

Die Coomassie Plus-Proteinbestimmung bildet mit Protein eine blaue Farblösung, die sich gut zur Detektion eignet. Von Nachteil ist jedoch, dass es aufgrund des sauren Milieus die Edelstahlkapillaren angreift. Des Weiteren hat sich in weiterführenden Untersuchungen gezeigt, dass die Bradford-Lösung Hitze-denaturiertes Vollblut nicht auflöst. Ausschlusskriterium für die Verwendung als Reinigungslösung ist ferner, dass sich unter statischen Bedingungen sehr schnell Farb-Proteinkomplexe ausbilden, die präzipitieren [295, 298]. Wird die Reinigungslösung einmal nicht komplett aus dem System entfernt und persistiert im System, ist das Risiko der Verstopfung von Kapillaren groß. Deshalb wurde dieses Reagenz nicht weiter in Erwägung gezogen.

Die Lowry Proteinbestimmung besteht aus zwei Lösungen. Die farblose Startlösung löst Hitze-denaturiertes Vollblut. Nachteilig ist jedoch die Zugabe eines weiteren Reagenzes. Dieses Reagenz ist darüber hinaus für eine Farbbildung unentbehrlich. Es besitzt im Vergleich zu der BCA-Proteinbestimmung einen kleineren Linearitätsbereich.

Wie die Lowry Proteinbestimmung löst die BCA-Proteinbestimmung Hitze-denaturiertes Vollblut. Mit einer Proteinmatrix kommt es zu einem optisch gut zu verfolgendem Farbwechsel von grün auf lila. Alle Inhaltsstoffe sind mit der Analysenplattform verträglich und sollten auch die massenspektrometrische Detektion nicht beeinflussen. Die Reagenzien dieses Bestimmungsverfahrens bilden mit anderen Stoffen, mit denen es im Analysensystem in Berührung kommen könnte, keine Komplexe. Von Vorteil ist der breite Linearitätsbereich.

Ausgewählt wurde die BCA-Proteinbestimmung, weil es sich am besten für ein on-line Verfahren eignet. Von Schlabach et al. wurde bereits eine Nachsäulendetektion mit einer Biuret Reaktion beschrieben [299]. Die Reaktion mit Proteinen kann durch eine Erhöhung der Temperatur beschleunigt werden. Die Umsetzung in der beheizten Edelstahlkapillare (HC) des Analysensystems bietet sich an. Unter diesen Bedingungen kann eine ausreichende Reaktionszeit garantiert werden. Einschränkend ist der minimale Fluss der HPD von 100µL/min. Daraus resultiert eine maximale Aufenthaltsdauer in der HC (Volumen ~ 60µL) von 36 Sekunden.

BCA-Proteinbestimmung

Das BCA-Reagenz besteht aus einer Mischung von Natriumhydrogencarbonat, Natriumcarbonat, Bicinchoninsäure, Natriumtartrat in 0,1molarer Natriumhydroxid- und 4%iger Kupfersulfatlösung.

Der Reaktionsmechanismus beruht auf der Reduktion von zweiwertigem Kupfer zu einwertigem Kupfer durch Protein in alkalischem Milieu. Im zweiten Reaktionsschritt wird das einwertige Kupfer durch zwei Bicinchoninsäuremoleküle komplex gebunden. Dieser Komplex ist violett und besitzt eine Absorption bei 562nm [296-297]. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 67 dargestellt.

Reduktion



Komplexation

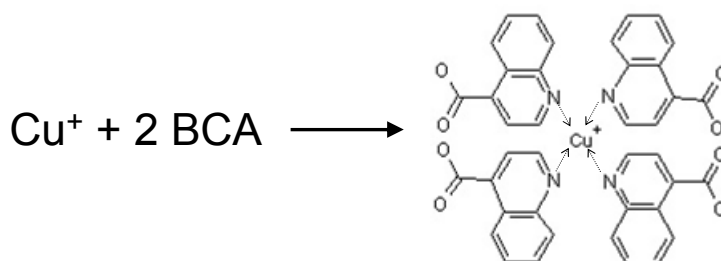


Abbildung 67: Reaktionsmechanismus der BCA-Proteinbestimmung.

Die BCA-Proteinbestimmung ist in zwei Konzentrationen erhältlich. Die Micro-BCA Proteinbestimmung eignet sich für die Detektion von Proteinlösungen mit einer Konzentration

von 0,5 bis 20µg/mL. Die BCA-Proteinlösung erfasst Proteine im Konzentrationsbereich von 20 bis 2.000µg/mL. Der Test ist äußerst sensitiv. Die Bestimmungsmethoden unterscheiden sich in der Anzahl der Reagenzien, die kurz vor der Anwendung zu vermischen sind und in den Reaktionsbedingungen. Für die sensitivere Micro-BCA Methode werden drei verschiedene Reagenzien und veränderte Reaktionsbedingungen wie erhöhte Temperatur und längere Inkubationszeit benötigt.

3.5.2 Beschreibung eines Reinigungszyklusses und der Reinigungskonditionen für das Analysensystem mit dem BCA-Protein-Reagenz

Für die Untersuchungen der Reinigungslösung wurde ein reduzierter instrumenteller Aufbau verwendet (siehe Abbildung 68). Das Reinigungsreagenz wird über die HPD in das System eingeleitet und durchfließt die Probenschleife, die beheizte Edelstahlkapillare, den In-line Filter und den UV-Detektor, bevor sie im Abfallbehälter aufgefangen wird. Der minimal einstellbare Fluss der HPD von 100µL/min bestimmt den Wirkungsgrad der Reinigung. Die beheizte Edelstahlkapillare wird für die Reinigung mit dem BCA-Reagenz auf 60°C temperiert. Die Reinigung ist abgeschlossen, sobald die Basislinie wieder erreicht wird. Die Reinigung wird jedoch für mindestens 100 Minuten durchgeführt. Die hinter dem UV-Detektor aufgefangene Reaktionslösung des kompletten Reinigungsprozesses dient anschließend der Berechnung der gesamten Menge an gelöster Proteinmatrix. Die Effizienz der Reinigung wird über die Komplexbildung des Reagenzes mit der abgelagerten Proteinmatrix („Biofilm“), d.h. über die Adsorption bei 562nm verfolgt. Das Reinigungsverfahren ist in Abbildung 68 dargestellt.

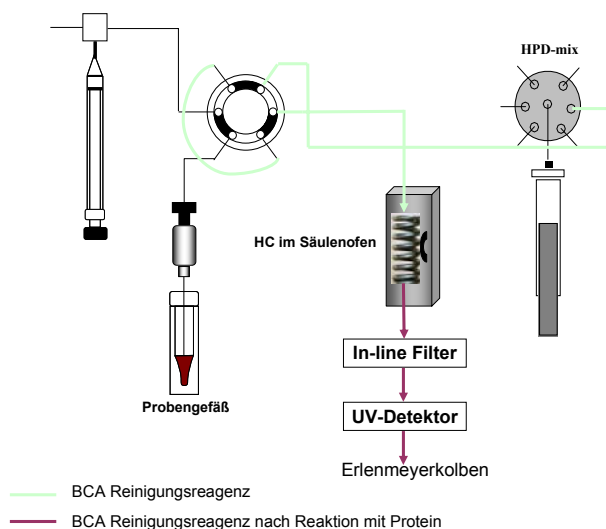


Abbildung 68: Instrumenteller Aufbau zur Untersuchung der Reinigungseffizienz. Das originale Symbiosis™ Pharma-System wurde auf die essentiellen Einheiten, d.h. Injektionseinheit, beheizte Edelstahlkapillare (HC) im Säulenofen, Hochdruckkolbenpumpe (HPD) und UV-Detektor zurückgebaut.

3.5.3 Adaption der off-line Proteinbestimmung zur Verwendung in einem on-line System – Quantifizierung des „Biofilms“ in der Prozessierungseinheit und in den Kapillaren

Um die abgelagerte Proteinmatrix, den „Biofilm“ im Analysensystem quantifizieren zu können, musste zuerst die statische off-line Bestimmungsmethode an ein dynamisches on-line Verfahren adaptiert werden. In Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass der weniger sensitive Assay zur Quantifizierung ausreichend ist. Wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, ist die Aufenthaltsdauer des Reinigungsreagenzes in der beheizten Edelstahlkapillare bei ständigem Fluss instrumentell bedingt auf 36 Sekunden begrenzt. Eine Reaktionstemperatur von 60°C ist über die beheizte Edelstahlkapillare möglich. Das Testvolumen berechnet sich aus der Reinigungszeit (mindestens 100 Minuten) multipliziert mit dem Fluss (100 µL/min) zu mindestens 10 mL. Im Gegensatz dazu werden im off-line Assay 1 mL Proteinlösung mit 1 mL Reagenz versetzt. Aus diesen Gründen erfolgte eine off-line Kalibration unter weitest gehender Anpassung an die on-line Bedingungen. Da die Proteinzusammensetzung bei jeder

Blutprobe unterschiedlich ist, erfolgte eine Kalibration mit Albumin als Standardlösung. In Tabelle 26 sind die verschiedenen Bedingungen gegenübergestellt.

Tabelle 26: Adaption einer off-line BCA-Proteinbestimmungsmethode zur Verwendung in einem on-line System.

| | BCA-Proteinbestimmung Bedingungen (statisch) | on-line-Bedingungen (dynamisch) | adaptierte off-line- Bedingungen (statisch) |
|------------------------|---|--|--|
| Reaktionslösung | BCA-Reagenz | BCA-Reagenz | BCA-Reagenz |
| Reaktionsbedingungen | 30 min bei 60°C | Flussrate : 100 µL / min (HPD) → Beheizzeit 35 sec bei 60°C in HC | Wasserbad : 35 sec bei 60°C |
| Detektion [nm] | 562 nm (540 - 590nm) | 578 nm | 578 nm |
| Inkubationsbedingungen | keine | 2 h bei Raumtemperatur | 2 h bei Raumtemperatur |
| Messzeitpunkt | nach 30 min | nach 2 h | nach 2 h |
| Testgefäß | Reagenzglas | Edelstahl- oder PEEK-Kapillare : 0,5 mm I.D. | Glaskapillare: 0,6 mm I.D. |

Abbildung 69 zeigt Kalibrationskurven die nach Gebrauchsanweisung der off-line Methode erhalten wurde (Standardbedingungen) und die angepasste Kalibrationskurve für das on-line-System.

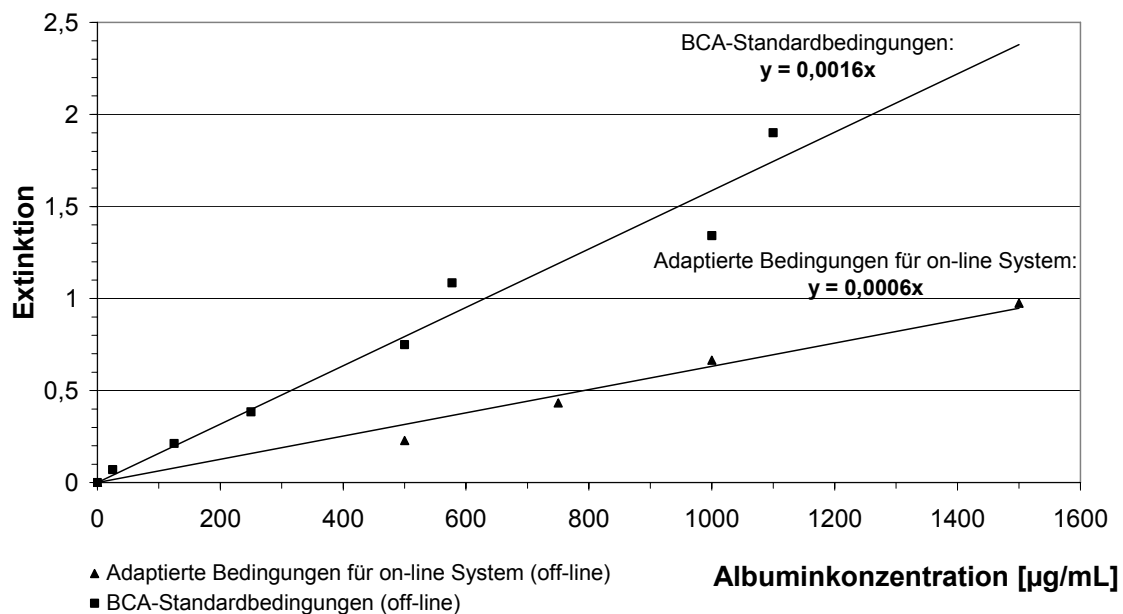


Abbildung 69: Kalibration der BCA-Proteinbestimmung. Gegenübergestellt ist die off-line Kalibration unter Standardbedingungen und die adaptierte Kalibration für das on-line System (off-line durchgeführt).

Durchgeführt wurde eine Mehrpunktkalibration zwischen 0-1.500µg/mL. Nach erfolgter Reinigung wird 1mL der aufgefangenen Reinigungslösung photometrisch bei 578nm vermessen. Ist eine Verdünnung der Reinigungslösung notwendig, so erfolgt diese mit der mobilen Phase des Systems [Methanol/Wasser (95/5, v/v)]. Die Berechnung des entstandenen „Biofilms“ erfolgt, indem die gemessene Extinktion in die entsprechende Kalibrationsgleichung eingesetzt wird und die Proteinkonzentration bezogen auf das ganze Volumen der Reinigungslösung errechnet wird. Es ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass diese Berechnung des „Biofilms“ nicht absolut, sondern „semiquantitativ“ ist. Jede Vollblutprobe weist eine unterschiedliche Zusammensetzung an Proteinen auf. Folglich hat jede Probe unterschiedliche Mengen an Aminosäuregruppen, die für die Farbgebung verantwortlich sind [300]. Es ist daher unmöglich, eine einheitliche Standardlösung zu finden. Aus diesem Grund erfolgte die Kalibration mit einer Albuminstandardlösung.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Quantifizierung von Proteinen mit Hilfe der BCA-Methode durch sehr lipidreiche Proben gestört werden kann. Dies führt zu fehlerhafter Farbgebung [301]. Diese Interferenz zeigt ebenfalls die Lowry-Reaktion [302]. Es ist zu beachten, dass bei einer massenspektrometrischen Detektion häufig Ammoniumsalze zum Einsatz kommen. Wenn eine solche mobile Phase gewählt wird, kann diese ebenfalls Einfluss auf die Farbgebung haben [303].

3.5.4 Evaluation des entwickelten Reinigungsverfahrens

Die Reinigungsmethode für ein on-line LC-MS/MS Analysengerät mit integrierter Probenprozessierung wurde hinsichtlich des Materials der Kapillaren, der Probenmatrix, der Temperatur und des Reagenzalters evaluiert.

3.5.4.1 Untersuchungen des Einflusses des Materials der Kapillaren und dessen Oberflächenbeschaffenheit auf die Entstehung eines „Biofilms“

Aus Vorversuchen war ersichtlich, dass das Material der verwendeten Kapillaren einen großen Einfluss auf deren Biokompatibilität, d.h. die Ablagerung einer Protein-/Lipid-Matrix hat. Um diesen Einfluss deutlich zu machen, erfolgten Untersuchungen, wobei das Material der Auslasskapillare nach der beheizten Edelstahlkapillare (HC) variiert wurde. Es wurden folgende gängigen HPLC-Materialien getestet: Edelstahl (V2A), PEEK und Edelstahl mit einer beschichteten Innenseite. Im ursprünglichen System besteht sowohl die Zuführungs- als auch die Auslasskapillare aus Edelstahl. Für die Evaluation des Einflusses des Materials der Auslasskapillare erfolgte der Vergleich von Rückdruckprofilen über 100, 200, 300 und 400 Prozessierungszyklen für jedes untersuchte Material. Zwischen der Aufnahme eines jeden Rückdruckprofils wurde das System, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, gespült. Die Aufnahme des Reinigungsprofils erfolgte mit Hilfe eines UV-Detektors bei 578nm. Die Aufzeichnung des Rückdrucks erfolgte manuell kontinuierlich zu verschiedenen Zeitpunkten. Das Limit für den Rückdruck lag bei 100bar. In diesem Fall erfolgte der Abbruch des Versuchs und sogleich eine Reinigung des Systems. Die Abbildung 70 zeigt den instrumentellen Aufbau diese Untersuchungen.

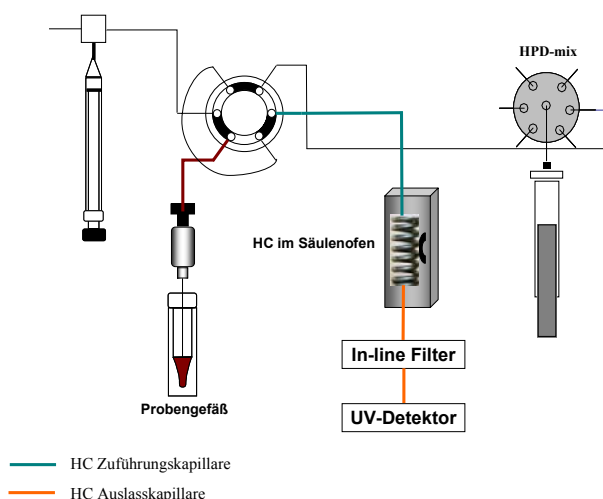


Abbildung 70: Instrumenteller Aufbau zur Evaluation der Biokompatibilität der verwendeten Kapillaren.

Alle Rückdruckprofile eines Materials sind der Reihenfolge nach in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 71). Die senkrechten gestrichelten Linien entsprechen den Reinigungszyklen. Nach jedem Reinigungszyklus wurde das System rückstandsfrei gesäubert.

Bei einer Auslasskapillare aus Edelstahl steigt der Rückdruck kontinuierlich in jedem Rückdruckprofil. Den höchsten Wert zeigt er erwartungsgemäß nach dem 400. Prozessierungszyklus. Er beträgt 53bar. Bei einem zusätzlichen Totvolumen steigt der Rückdruck exponentiell schneller. Bei diesen Untersuchungen zeigt der Rückdruck nach 200 Prozessierungszyklen bereits 43 bar. Im Gegensatz dazu wird keine Rückdruckerhöhung nach mehr als 400 Prozessierungszyklen beobachtet, wenn die Auslasskapillare aus PEEK gefertigt war. Mit der innen beschichteten Edelstahlkapillare als Auslasskapillare steigt der Rückdruck schneller und unkontrollierter während der 400 Prozessierungszyklen an als mit einer unbeschichteten Edelstahlkapillare.

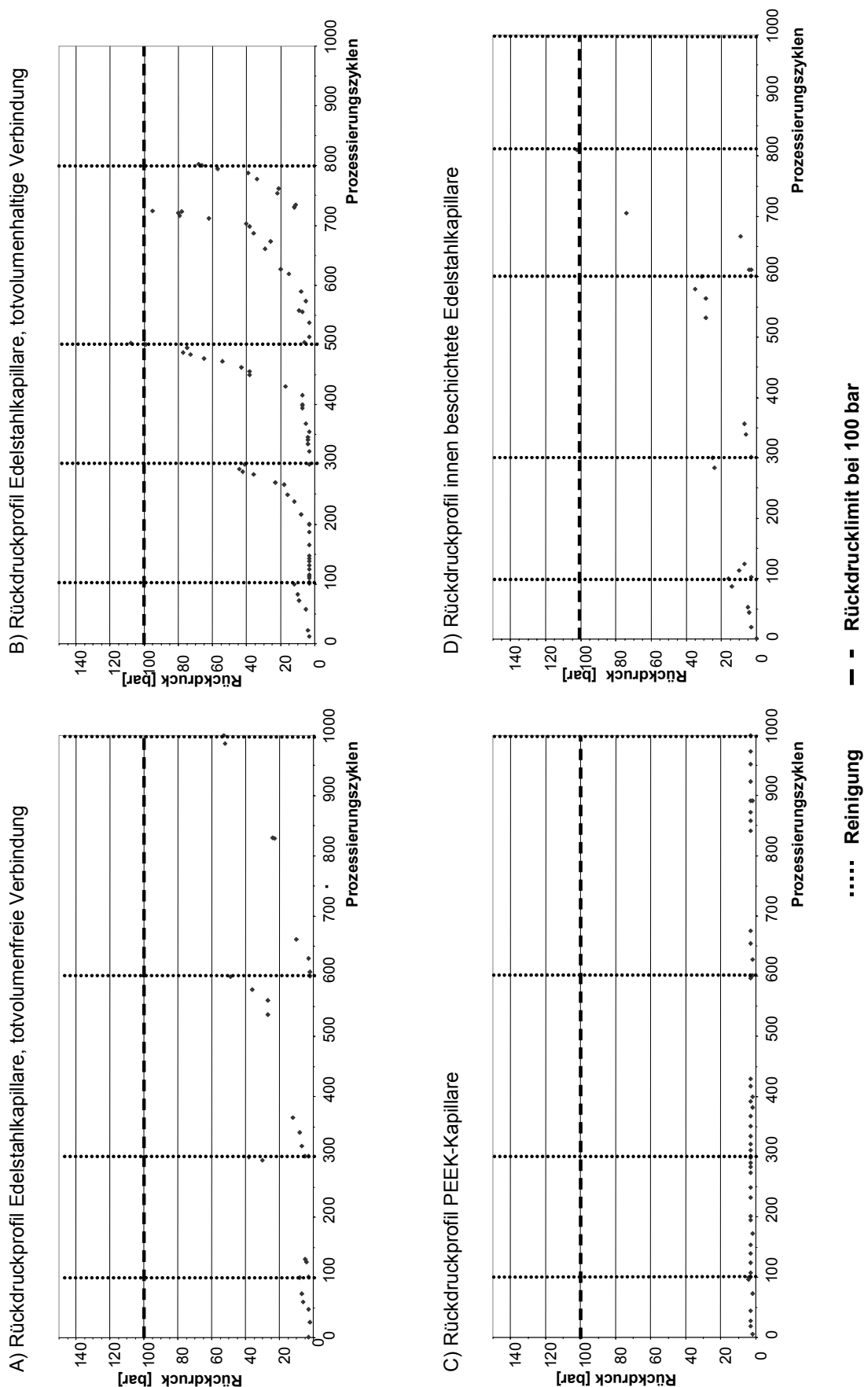


Abbildung 71: Rückdruckprofile mit verschiedenen Materialien der Auslasskapillare: A) Edelstahlkapillare mit totvolumenfreier Verbindung, B) Edelstahlkapillare mit totvolumenhaltiger Verbindung, C) PEEK-Kapillare und D) innen beschichtete Edelstahlkapillare.

Abbildung 72 zeigt die erhaltenen Reinigungsprofile. Je nach Anzahl der vorangegangenen Prozessierungszyklen erfolgt der Abfall des Signals zwischen 10-40 Minuten. Es ist ein klarer Trend ersichtlich: je mehr Prozessierungszyklen vor der Reinigung durchgeführt wurden, desto breiter ist das Signal und umso größer ist die Fläche unter dem Signal. Dieser Trend zeigt sich unabhängig von dem Material der Auslasskapillare. Bei fast allen Reinigungsprofilen erreicht das Signal wieder die Ausgangsintensität. Kleinere regelmäßige Signalungleichmäßigkeiten in 20-minütigen Abständen sind auf das Nachladen der Hochdruckkolbenpumpe (HPD) zurückzuführen, die die Reinigungslösung befördert.

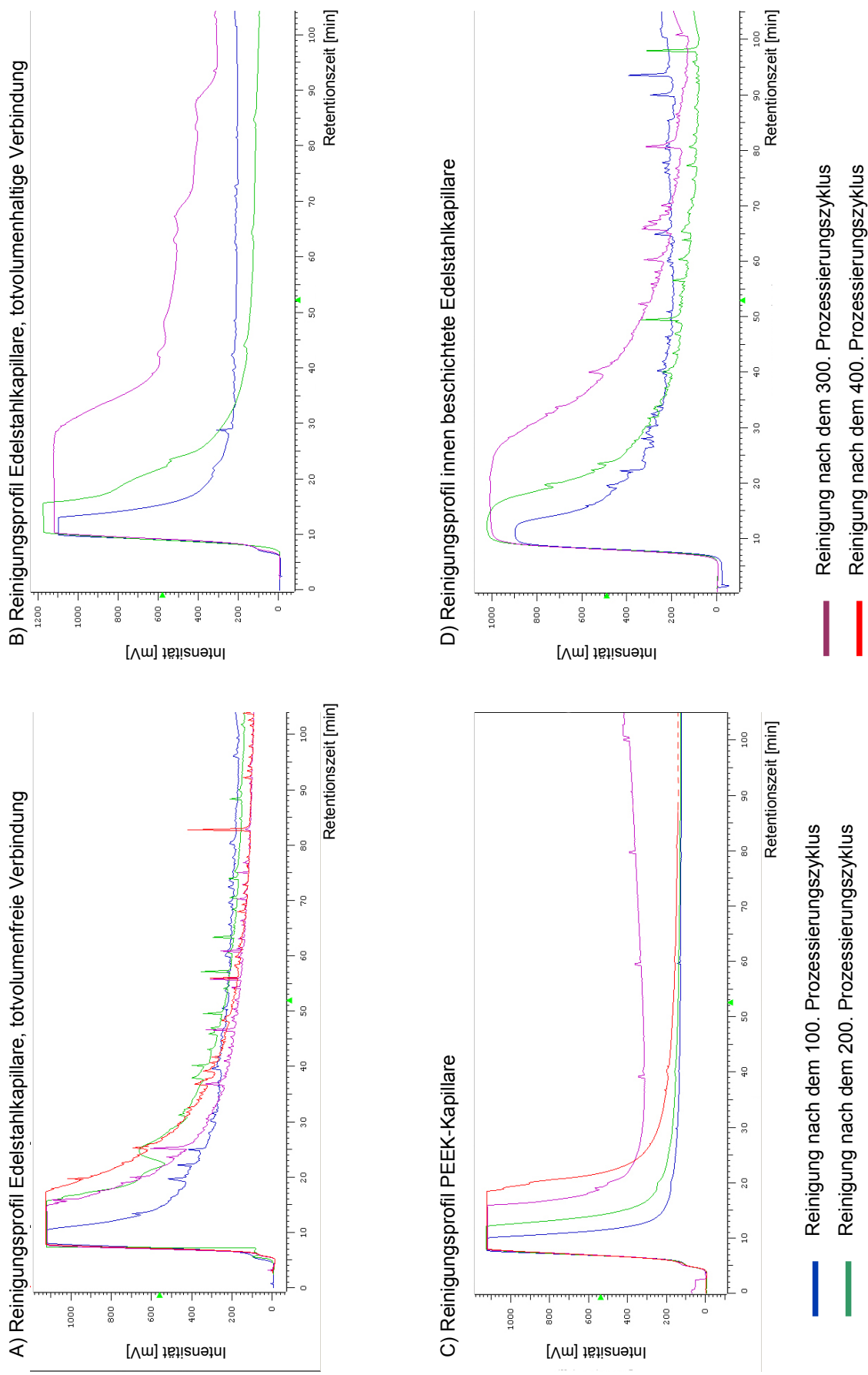


Abbildung 72: Reinigungsprofile mit verschiedenen Materialien der Auslasskapillare: A) Edelstahlkapillare mit totolumenfreier Verbindung, B) Edelstahlkapillare mit totolumenhaltiger Verbindung, C) PEEK-Kapillare und D) innen beschichtete Edelstahlkapillare.

Bis auf geringe Abweichungen ist eindeutig zu erkennen, dass die Menge an abgelagerter Proteinmatrix mit der Anzahl der Prozessierungszyklen zunimmt. Dementsprechend werden die Reinigungskurven breiter und die totale Reinigungszeit steigt. Der Versatz der Basislinien am Ende jeder Reinigung ist mit wechselnden Raumtemperaturen zu erklären. Anhand dieser Reinigungskurven bestätigt sich wiederholt die Annahme, dass PEEK das biokompatiblere Material ist. Folglich könnte die Reinigung des Systems mit einer PEEK-Auslasskapillare bis einschließlich 400 Prozessierungszyklen nach 30 Minuten beendet werden. Bei einem System mit einer Auslasskapillare aus Edelstahl benötigen die jeweiligen Reinigungen über eine Stunde, um den Rückdruck auf die Ausgangsbedingungen zu reduzieren. Die Reinigungsprofile einer innen beschichteten Edelstahlkapillare zeigen starke Ähnlichkeiten mit den Reinigungsprofilen einer unbeschichteten, totvolumenhaltigen Edelstahlkapillare. Die Reinigung nach 300 Prozessierungszyklen dauert mit beiden Kapillarenmaterialien ca. 100 Minuten. Dadurch bestätigt sich die Annahme, dass eine ungleichmäßige innere Oberfläche (durch totvolumenhaltige Verbindungen oder durch Beschichtung) zu schnelleren Ablagerungen von Proteinen im Lumen der Kapillare führt.

In Tabelle 27 sind die berechneten Mengen an abgelagerter Proteinmatrix („Biofilm“) der vorher beschriebenen Untersuchungen gegenübergestellt. Die Gesamtproteinmenge berechnet sich aus der injizierten Menge an Vollblut.

Tabelle 27: Berechnete Menge an abgelagerter Proteinmatrix („Biofilm“) nach 100, 200, 300 und 400 Prozessierungszyklen und im Vergleich zur Gesamtproteinmenge.

| Material Auslasskapillare | Anzahl Prozessierungszyklen | Gesamtprotein [mg] | "Biofilm" [mg Albumin] | "Biofilm" [% aus Gesamtprotein] |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------|------------------------------------|
| PEEK | 100 | 708 | 6,19 | 0,87 |
| PEEK | 200 | 1.415 | 8,26 | 0,61 |
| PEEK | 300 | 2.123 | 9,69 | 0,46 |
| PEEK | 400 | 2.830 | 7,60 | 0,27 |
| innen beschichteter Edelstahl | 100 | 708 | 7,80 | 0,57 |
| innen beschichteter Edelstahl | 200 | 1.415 | 11,17 | 0,82 |
| innen beschichteter Edelstahl | 300 | 2.123 | 24,74 | 1,17 |
| innen beschichteter Edelstahl | 260 | 2.830 | 17,00 | 0,94 |
| Edelstahl | 100 | 708 | 4,35 | 0,61 |
| Edelstahl | 200 | 1.415 | 12,07 | 0,85 |
| Edelstahl | 300 | 2.123 | 16,65 | 0,78 |
| Edelstahl | 400 | 2.830 | 19,44 | 0,69 |

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass der „Biofilm“ wie erwartet mit der Anzahl der Prozessierungszyklen ansteigt. Vergleichend konnten innerhalb von 400 Prozessierungszyklen

bei Edelstahl bis zu 20mg „Biofilm“ nachgewiesen werden, während es bei PEEK unter 10mg waren. Darüber hinaus lagerten sich bei Edelstahl ca. $0,75\% \pm 0,15$ der gesamten Proteinmenge als „Biofilm“ in den Kapillaren ab. PEEK wies bei einer geringeren Anzahl an Prozessierungszyklen vergleichbare Werte auf. Auch aus dieser Gegenüberstellung ist klar zu entnehmen, dass PEEK das biokompatiblere Material ist. Daher wurden alle Kapillaren, die mit der Matrix Vollblut direkt in Verbindung kommen, in Kapillaren aus PEEK ausgetauscht.

3.5.4.2 Untersuchungen des Einflusses des Kapillarenmaterials und dessen Wärmeleitfähigkeit auf die Entstehung eines „Biofilms“

Untersuchungen zum Einfluss des Kapillarenmaterials und dessen Wärmeleitfähigkeit auf die Bildung eines „Biofilms“ erfolgten über Infrarotmessungen. Dafür wurde der Probenfluss durch das System mit einer Infrarotkamera beobachtet. Aufnahmen erfolgten an unterschiedlichen Schlüsselpunkten der Analysenplattform zu verschiedenen Zeitpunkten. Als Schlüsselstellen wurden folgende Punkte festgelegt: 1. beheizte Edelstahlkapillare, 2. direkt hinter der beheizten Edelstahlkapillare, 3. Verbindungsstück, 4. direkt hinter dem Durchlass, 5. in der Mitte der Auslasskapillare der beheizten Edelstahlkapillare und 6. Ventil. Infrarotmessungen ermöglichen eine schnelle Bestimmung der aktuellen Außentemperatur der untersuchten Kapillaren. So kann das Temperaturprofil in einer mit einer Probe durchflossenen Kapillare während und nach Erhitzung der Kapillare bzw. der Probe auf elegante Weise dargestellt werden. Die gemessenen Außentemperaturen lassen im Rückschluss Aussagen über die Temperatur im Inneren der Kapillaren und über die Wärmeleitfähigkeit der eingesetzten Materialien zu.

Die linke Seite der Abbildung 73 zeigt die Injektionseinheit in der Frontansicht. Die rechte Seite zeigt die Seitenansicht. Im oberen Teil ist der reale instrumentelle Aufbau zu sehen, während im unteren Teil Aufnahmen der jeweiligen Aufbauten durch eine Infrarotkamera abgebildet sind. Die Infrarotbilder entstanden bei der Verwendung der Edelstahlkapillaren beispielhaft zum Zeitpunkt der Prozessierung einer Probe in der beheizten Edelstahlkapillare. Zu erkennen ist, dass sich der Hitzeherd der beheizten Kapillare am äußeren Ende des isolierten Teiles befindet. Er weist eine Außentemperatur von über 50°C auf. Der Rest dieses

Heizelementes zeigt Temperaturen um 45°C. Auch die Kapillaren in der Frontansicht besitzen erhöhte Temperaturen. Im Gegensatz dazu weisen die Kapillaren in der Seitenansicht nur noch Temperaturen um 30°C auf.

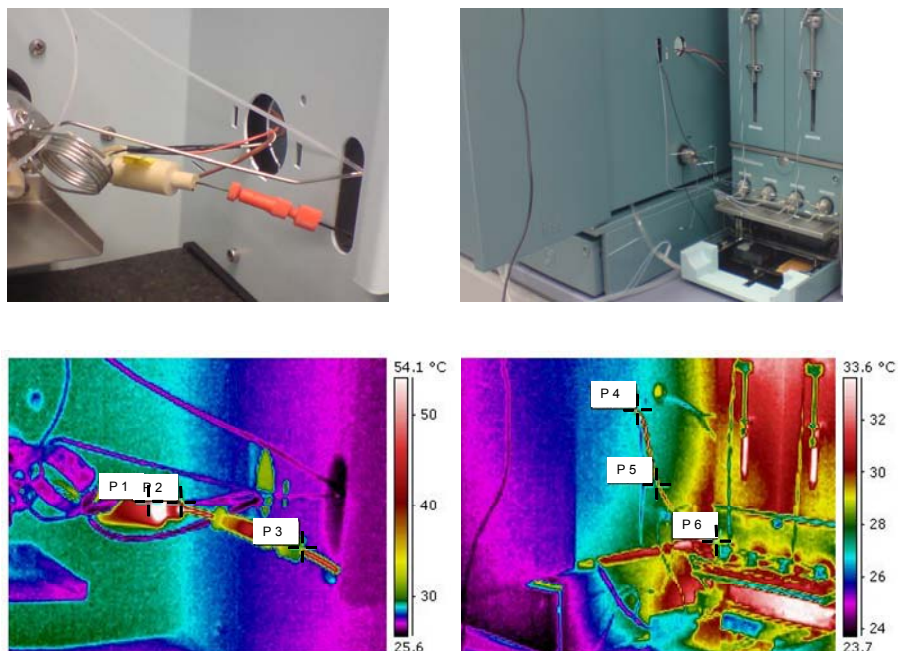


Abbildung 73: Infrarotmessung wichtiger Schlüsselpunkte im Analysensystem. P1 = beheizte Edelstahlkapillare, P2 = direkt hinter der beheizten Edelstahlkapillare, P3 = Verbindungsstück, P4 = direkt hinter dem Durchlass, P5 = in der Mitte der Auslasskapillare der beheizten Edelstahlkapillare, P6 = Ventil; (links: Frontansicht, rechts: Seitenansicht).

Tabelle 28 stellt gemessene Temperaturen zum Zeitpunkt der Prozessierung einer Probe an verschiedenen Schlüsselpunkten im System gegenüber. Darüber hinaus sind die Messergebnisse für Edelstahlkapillaren im Vergleich zu Messergebnissen für PEEK-Kapillaren zu entnehmen. Die Temperaturen an den verschiedenen Messpunkten nehmen vom ersten Schlüsselpunkt bis zum letzten ab. Die Außentemperaturen der PEEK-Kapillaren sind im Vergleich zu den Edelstahlkapillaren bei den ersten drei Messpunkten um 5-10°C niedriger, während sie bei den letzten drei Messpunkten ähnlich sind.

Tabelle 28: Infrarotmessung der Außentemperaturen der Kapillaren. Gemessen an wichtigen Schlüsselstellen des Analysensystems (vergleiche Abbildung 73).

| Position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------|---------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| | HC [°C] | gleich hinter HC [°C] | gleich hinter Verbindungsstück [°C] | gleich hinter Durchlass [°C] | in der Mitte der Kapillare [°C] | kurz vor dem Ventil [°C] |
| Edelstahl | 63 | 50 | 50 | 35 | 32 | 32 |
| PEEK | 57 | 35 | 40 | 36 | 36 | 33 |

Die beheizte Edelstahlkapillare wurde in beiden Untersuchungen auf 75°C aufgeheizt. Auffällig ist, dass die PEEK-Auslasskapillare bei den ersten drei Messpunkten eine wesentlich geringere Außentemperatur aufweist als die Edelstahlkapillare. Dies ist mit der Wärmeleitfähigkeit der Materialien zu erklären. Edelstahl besitzt eine höhere Wärmeleitfähigkeit (21W/m*K) als das Material PEEK (0,25 W/m*K) [304-305]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass PEEK die Temperatur der Probe besser speichert und daher der Wärmeaustausch mit der Umgebung verlangsamt ist. Die Probe demnach bleibt länger erwärmt. Weiterhin ist anzunehmen, dass daraus die schnellere Entstehung eines „Biofilms“ in Edelstahlauslasskapillaren resultiert. Durch das schnelle Abkühlen der Probe hinter der HC entsteht ein erhöhtes Risiko für lokale Proteinablagerungen und Ablagerungen von Lipiden Partikeln. Durch die langsamere Abkühlung der Probe in PEEK-Kapillaren bilden sich Ablagerungen über eine größere Strecke. Diese Beobachtungen wurden noch einmal erhärtet, indem eine PEEK-Auslasskapillare während der Prozessierungszyklen ständig mit Eis gekühlt wurde (Daten nicht gezeigt). Es kam zu keiner signifikanten Änderung in der „Biofilmbildung“. Es ist davon auszugehen, dass durch die geringe Wärmeleitfähigkeit von PEEK auch die von außen zugeführte Kälte keinen Einfluss auf die Probertemperatur hat.

3.5.4.3 Untersuchungen des Einflusses des Hämatokrits

Untersuchungen zum Einfluss der Zusammensetzung einer Vollblutprobe erfolgten hauptsächlich in Bezug auf den Hämatokrit. Es ist anzunehmen, dass der Hämatokritwert

einer Vollblutprobe einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung des Biofilms hat. Gängige Hämatokritwerte sind in Tabelle 2 dargestellt.

Für die Bestimmung des Einflusses des Hämatokritwertes auf die Entstehung eines „Biofilms“ wurden Vollblutproben mit Hämatokritwerten zwischen 0,1 und 0,4 untersucht. Die Einstellung der entsprechenden Hämatokritwerte erfolgte über die Verdünnung einer Vollblutprobe (HCT: 0,4) mit Spenderplasma der Blutgruppe AB. Es wurden Aliquote mit Hämatokritwerten 0,1, 0,2, 0,3 und 0,4 hergestellt. Als Referenzprobe diente eine reine Spenderplasmaprobe der Blutgruppe AB. Alle Proben unterlagen 200 Prozessierungszyklen im Analysensystem (siehe Kapitel 3.4.1.1). Im Anschluss wurde das Analysensystem, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, gereinigt. Die Berechnung des „Biofilms“ erfolgte nach der in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Methode.

Abbildung 74 zeigt die Ergebnisse: nach 200 Prozessierungszyklen erzeugt eine Vollblutprobe mit einem Hämatokritwert von 0,4 einen „Biofilm“ von 16,63mg. Eine Plasmaprobe zeigt nach 200 Prozessierungszyklen nur einen „Biofilm“ von 2,52mg. Die Proben mit den künstlich erzeugten Hämatokritwerten von 0,1-0,3 ergeben nach 200 Prozessierungszyklen einen „Biofilm“ von 4,69-10,83mg.

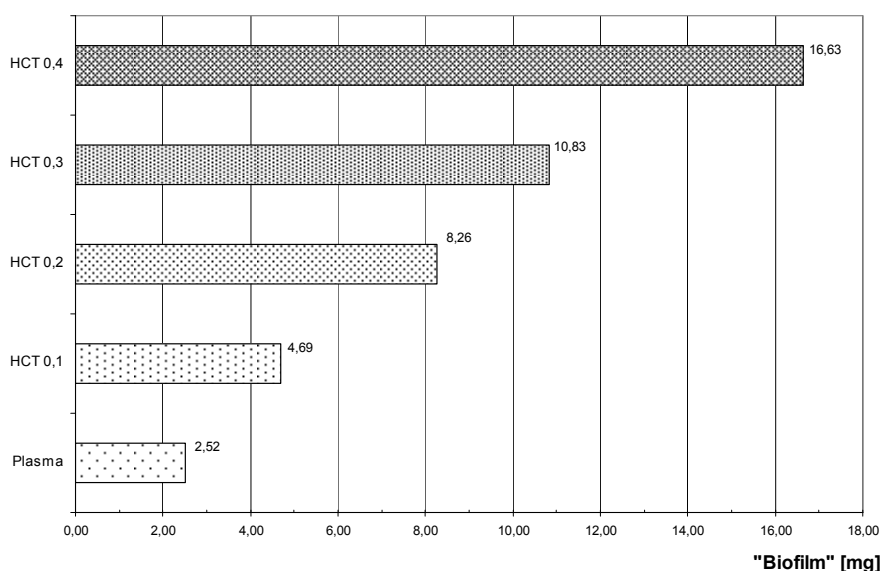


Abbildung 74: Untersuchung des Einflusses der Probenmatrix. Die Entstehung eines „Biofilms“ wurde auf den Einfluss des Hämatokritwertes bezogen.

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen dem Hämatokritwert einer Vollblutprobe und dem entstehenden „Biofilm“ besteht.

Obwohl in diesem Kapitel ausschließlich der Einfluss des Hämatokritwertes auf die Entstehung eines „Biofilms“ untersucht worden ist, gibt es noch weitere Faktoren, die Einfluss nehmen können. Es ist anzunehmen, dass neben den zellulären Bestandteilen einer Vollblutprobe besonders Protein- und Lipidablagerungen die Entstehung eines „Biofilms“ fördern. Große Volumenanteile im Vollblut haben die Hämoglobinfraction aus den Erythrozyten, die Lipide aus den Zellmembranen sowie Albumin, Globuline und Lipoproteine aus der Plasmafraction (siehe Tabelle 1, Tabelle 3 und Abbildung 2). Die Einflüsse von Hämoglobin und Phospholipiden werden in dieser Arbeit in den Kapiteln 3.4.2.2 und 3.4.5 gesondert untersucht.

3.5.4.4 Untersuchungen des Einflusses des Alters des Reinigungsreagenzes

In diesem Kapitel erfolgen Untersuchungen zum Einfluss des Alters des Reinigungsreagenzes. Aus diesem Grund wurde ein großer Ansatz an Reinigungslösung frisch hergestellt. Ein Aliquot dieser Lösung unterlag einer zweiwöchigen Lagerung bei Raumtemperatur, während ein weiteres Aliquot vier Wochen im Kühlschrank lagerte. Mit dem dritten Aliquot erfolgten sofort zwei Reinigungen nach 200 Prozessierungszyklen unter Verwendung einer PEEK Auslasskapillare. Die Durchführung der Reinigungen mit den gelagerten Aliquoten fand nach den entsprechenden Lagerzeiten unter gleichen Bedingungen statt. Vor jeder Reinigung wurde ein Aliquot von 1mL von der Reinigungslösung abgenommen. Dies diente später als Referenzwert bei der UV-Detektion zur Bestimmung des „Biofilms“. Die Ergebnisse sind in Abbildung 75 dargestellt. Der Grafik ist zu entnehmen, dass mit den frisch hergestellten Reagenzien vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Die beiden gelagerten Reinigungsreagenzien ergaben im Vergleich einen um 50% reduzierten „Biofilm“.

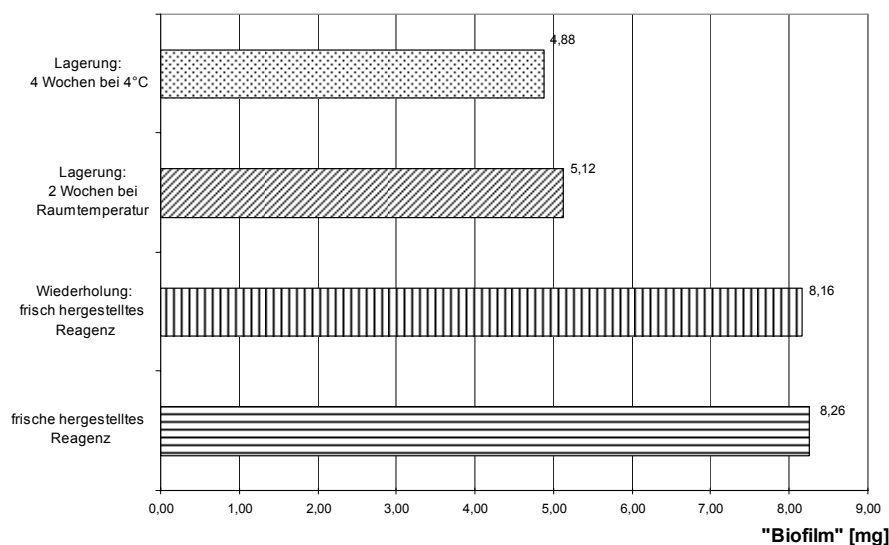


Abbildung 75: Einfluss des Alters des Reinigungsreagenzes auf die Bestimmung des „Biofilms“.

Experimentell konnte festgestellt werden, dass die frisch hergestellte Reinigungslösung (mintgrün) im Laufe der Zeit über einen Grauton die Detektionsfarbe (violett) annimmt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass während der Lagerung bereits eine Farbreaktion stattfand. Die Berechnung des „Biofilms“ unterliegt damit nicht denselben Bedingungen wie zum Zeitpunkt der Kalibration. Es resultieren falsch negative Resultate. Die Bedienungsanleitung der BCA-Methode postuliert ein stabiles Reinigungsreagenz über mehrere Tage, wenn es verschlossen bei Raumtemperatur gelagert wird [296].

3.5.5 Untersuchungen zur Bildung von Agglomeraten während des Prozessierungs- und des Reinigungsverfahrens

Um die Bildung von Agglomeraten und Ablagerungen während des Prozessierungs- und des Reinigungsverfahrens zu untersuchen, wurde ein in-line Filter in das System integriert. Der in-line Filter ist durch seinen kleinsten Porendurchmesser von $1\mu\text{m}$ charakterisiert. Auf diese Weise hält er alle Bestandteile zurück, die größer als $1\mu\text{m}$ sind. So können durch hypotone Lyse entstandene „Ghosts“ oder Agglomerate abfiltriert werden, bevor sie die Analysenplattform verstopfen. Der Aufbau eines solchen Filters ist in Abbildung 76 zu sehen. Ein in-

line Filter besteht aus einem dreilagigen Edelstahlsieb, der im totvolumenfreien Gehäuse mit einer Druckschraube befestigt wird.

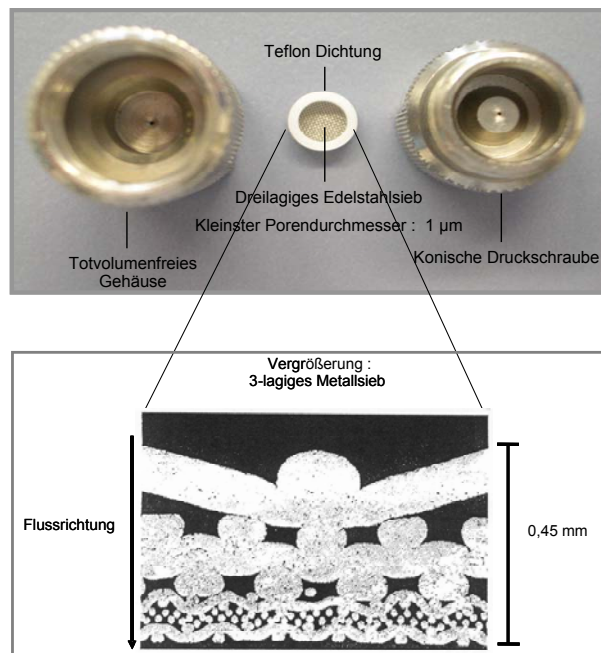


Abbildung 76: Aufbau eines in-line Filters [306].

In zahlreichen Untersuchungen kam es in seltenen Fällen zu Ablagerungen auf dem in-line Filter. Abbildung 77 zeigt beispielhaft eine gelartige Ablagerung.

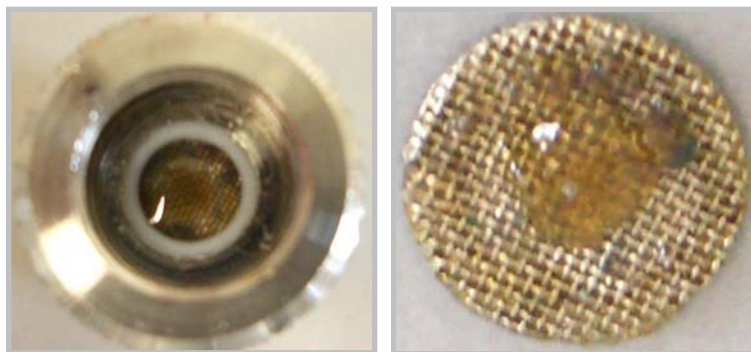


Abbildung 77: Gelartige Ablagerung auf dem in-line Filter.

Aus den Versuchsbedingungen allein konnten keine eindeutigen Rückschlüsse auf deren Entstehung gezogen werden. Die Ablagerungen unterlagen weiteren Untersuchungen. Es erfolge ein Test des Gels auf Cholesterin mit der Liebermann-Reaktion. Der Test verlief negativ. Da in der vorgegebenen Zeit keine weiteren Hinweise auf den Ursprung der Ablagerungen gefunden werden konnten, fand ein Abbruch der Untersuchungen bezüglich der gelartigen Ablagerung statt. Es ist dennoch anzunehmen, dass derartige Ablagerungen in

irgendeiner Weise aus Zellmembranbestandteilen bestehen. Häufiger konnten weiße Schlieren auf dem In-line Filter beobachtet werden, die sich mit dem Reinigungsreagenz auflösen. Bei weiteren Ablagerungen auf dem In-line Filter erfolgte ein Austausch des Filters.

Nach den derzeitigen Erkenntnissen beeinflussen die verwendeten Reagenzien auch den sensitiven Massenspektrometer nicht. Beschrieben wurde allerdings eine Oligomerisation von Peptiden durch zweiwertiges Kupfer [307]. Im vorgestellten Analysensystem wird keine Beeinflussung dieser Art erwartet, da störende Proteine durch die intensive Probenaufbereitung abgetrennt werden.

3.6 Eignungsnachweis der MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Triple-Kartuschen Modus) für die Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut

Um die Eignung der on-line MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode für die Analyse von Immunsuppressiva nach in-line Prozessierung von Vollblut nachzuweisen, wurden verschiedene Parameter einer späteren Validierung untersucht. Eine Validierung der gesamten Analysenplattform war wegen unvollständiger Instrumentierung nicht möglich. Ein geeigneter Autosampler, der das gleichmäßige Pipettieren und Mischen von Suspensionen bzw. viskosen Flüssigkeiten wie Vollblut ermöglicht, ist derzeit noch bei der Firma Spark Holland in der Entwicklung und war daher nicht verfügbar. Das Mischen der Proben sowie die Zugabe des Internen Standards erfolgten daher manuell.

Das Ziel bei der Validierung einer analytischen Methode ist zu zeigen, dass sie für den beabsichtigten Zweck geeignet ist [308]. Eine Validierung von Vollblut ist unter Berücksichtigung allgemeiner Standards für die pharmazeutische Industrie, insbesondere für bioanalytische Methoden, durchzuführen [132, 308]. Fundamentelle Parameter sind Richtigkeit, Präzision, Selektivität, Linearität, Sensitivität, Robustheit und Wiederfindung

[132, 308]. Die Selektivität und Robustheit der ausgearbeiteten Analysenplattform wurden bereits in den Kapiteln 3.3.4 und 3.4 ausführlich beschrieben und nachgewiesen.

Erste Untersuchungen der on-line MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode im Triple-Kartuschen Modus für die Analyse von Immunsuppressiva nach in-line Prozessierung von Vollblut erfolgten am umgebauten Symbiosis™ Pharma Analysengerät gekoppelt an das Quattro Micro™ Tandem Massenspektrometer. Erschwerende Bedingungen resultierten aus dem manuellen Mischen sämtlicher Vollblutproben zeitnah vor jeder Injektion. Darüber hinaus war die Punktiernadel wegen starker Kontaminations- und Verschleppungsgefahr aus dem Autosampler zu entfernen. Demzufolge konnten die Probengefäße nicht verschlossen werden, weswegen ein Verdampfen des hohen organischen Anteils in den Standardproben ohne Matrix und das Austrocknen von Vollblutproben nicht verhindert werden konnte. Kalibrationsgeraden ohne Matrix resultierten in Korrelationskoeffizienten von $0,995 \pm 0,02$. Die Präzision lag jedoch nicht immer innerhalb des geforderten 15% Abweichungsintervalls. Die Berechnung der Richtigkeit ergab, dass die Wiederfindungsrate ca. 80% beträgt. Kalibrationsgeraden aus Vollblut ergaben einen Korrelationskoeffizienten von $0,92 \pm 0,02$. Die Präzision der Vollblutproben war gegenüber der Präzision aus Standardlösung ebenfalls erniedrigt. Eine Wiederfindungsrate von ca. 80% wurde hingegen bestätigt. Weitere große Nachteile dieses Aufbaus waren die zu hohen Detektions- und Quantifizierungsgrenzen. Das geforderte Limit für die Quantifizierung von 1 ng/mL für einige Analyte konnte nur bei Kalibrationsgeraden ohne Matrix erreicht werden. Das verwendete Quattro Micro™ Tandem Massenspektrometer war für diese Anforderungen nicht sensitiv genug.

Die bislang beschriebenen Versuche wurden ausschließlich im Labor für BioSeparation, München, durchgeführt. Um die Ergebnisqualität zu verbessern und um die bisherigen Versuchsergebnisse zu erhärten, wurden zusätzliche Untersuchungen am Institut für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung, Nürnberg-Heroldsberg, an einem „API 5000 mit QJet Ion Guide“ der Firma MDS SCIEX durchgeführt. Dazu erfolgte die in-line Prozessierung und chromatographische Aufbereitung der Vollblutproben mit Hilfe der entwickelten on-line MD-SPE Plattform im Triple-Kartuschen Modus. Dabei wurden verschiedene Fraktionen aufgefangen und unter Vakuum zur Trockene eingengt. Im

Anschluss wurden dieselben Proben in 100µL mobiler Phase [Methanol/10mmol Ammoniumacetat (80/20, v/v)] resuspendiert. Wegen der Vielzahl der Proben wurde mit der Probenvorbereitung ca. 6 Wochen vorher begonnen. Für den Zeitraum von der Herstellung bis zur Vermessung erfolgte die Lagerung fachgerecht bei -20°C. Der Einfluss dieser Prozedur wird bei der Diskussion der Messergebnisse berücksichtigt.

3.6.1 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit ist das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als richtig angesehenen Wert. Dieser Parameter stellt das Maß für den systematischen Fehler dar. Mit der Präzision wird das Maß für die Streuung der Analysenergebnisse um einen Mittelwert bestimmt. Die Streuung ist das Ergebnis von zufälligen Fehlern.

Bei der Bestimmung der Richtigkeit und der Präzision handelt sich um Wiederfindungsexperimente nach Zusatz einer bekannter Menge an Analyt (Referenzsubstanz). Steht ein geeignetes Referenzmaterial zur Verfügung, so wird der zertifizierte Wert als richtiger Wert angenommen. Die Wiederfindungsrate bei der Bestimmung der Richtigkeit ist demnach durch das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe bestimmt. Laut der amerikanischen Arzneimittelkommission (Federal Drug Administration of the United States, FDA) sollte der Mittelwert nicht mehr als 15% vom wahren Wert abweichen. Am unteren Quantifizierungslimit (Lower Limit of Detection, LLOQ) sind sogar 20% Abweichung erlaubt. Bei der Bestimmung der Präzision sollte die Standardabweichung nicht größer als 15% sein. Am LLOQ sind 20% Standardabweichung erlaubt [132].

Für die Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut sind lyophilisierte Vollblutproben verschiedener Analytkonzentrationen als Referenzmaterialien kommerziell erhältlich [309-310]. Diese eignen sich jedoch nicht für eine in-line Prozessierung. Werden diese Proben erhitzt, verklumpen sie und verstopfen infolgedessen Kapillaren, Kartuschen und Ventile. Da diese Matrix (lyophilisiertes Vollblut) darüber hinaus auch nicht vollkommen mit den in

dieser Arbeit untersuchten Vollblutproben und den aus ihnen gewonnenen CDB-Proben übereinstimmen, erfolgte die Anwendung einer anderen Referenzkalibration. Dafür wurden reale Matrixproben (Vollblut) mit drei verschiedenen therapeutischen Konzentrationen an Analyt dotiert. Die Konzentrationsbereiche wurden ähnlich den lyophilisierten Kalibratoren der Firma Recipe gewählt. Die Dotierung der Proben erfolgte daher mit (250, 500 und 1.000ng/mL) Ciclosporin A, mit (10, 20 und 40ng/mL) Tacrolimus sowie jeweils mit (11,25, 22,5 und 45ng/mL) Sirolimus und Everolimus. Eine zweite Referenzkalibration erfolgte aus Standardlösung. Dafür wurde mobile Phase [Methanol/10mmol Ammoniumacetat (80/20, v/v)] mit sechs verschiedenen therapeutischen Konzentrationen an Analyt dotiert. Die Dotierung der Standardlösung erfolgte mit (31,25, 62,5, 125, 250, 500 und 1.000ng/mL) Ciclosporin A, mit (1,25, 2,5, 5, 10, 20 und 40ng/mL) Tacrolimus sowie jeweils mit (1,41, 2,82, 5,63, 11,25, 22,5 und 45ng/mL) Sirolimus und Everolimus.

Von jeder Probe wurden 25µL in das System injiziert, in-line prozessiert und mit der MD-SPE-Plattform im Triple-Kartuschen Modus aufbereitet. Das Eluat (1,8mL) der dritten Kartusche wurde dabei aufgefangen, zur Trockene eingeeengt und in 100µL mobiler Phase resuspendiert. Ein Blindwert wurde ebenfalls vermessen. Die Ergebnisse der Bestimmung von dotierter Standardlösung zeigt Tabelle 29.

Tabelle 29: Bestimmung der Richtigkeit und der Präzision: Analyse von Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus aus dotierter Standardlösung [Methanol/10mmol Ammoniumacetat (80/20, v/v)]; System: MD-SPE Plattform im Triple-Kartuschen Modus nach in-line Prozessierung.

| | Konzentration dotiert [ng/mL] | Konzentration berechnet [ng/mL] | n = 2 | |
|---------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|------------------|
| | | | Richtigkeit [%] | Präzision [%] |
| Ciclosporin A | 0,00 | - | - | - |
| | 31,3 | 33,8 | 108,2 | 6,1 |
| | 62,5 | 60,4 | 96,6 | 11,0 |
| | 125,0 | 119,1 | 95,3 | 3,0 |
| | 250,0 | 244,5 | 97,8 | 12,4 |
| | 500,0 | 511,0 | 102,2 | 4,5 |
| | 1000,0 | 1148,8* | 114,9* | k.A. |
| Tacrolimus | 0,00 | - | - | - |
| | 1,25 | 1,2 | 99,6 | 10,7 |
| | 2,50 | 2,6 | 102,1 | 8,7 |
| | 5,00 | 4,8 | 96,8 | 6,3 |
| | 10,00 | 9,7 | 97,2 | 5,9 |
| | 20,00 | 21,4 | 106,8 | 2,3 |
| | 40,00 | 39,0 | 97,7 | 0,7 |
| Sirolimus | 0,00 | - | - | - |
| | 1,41 | 1,3 | 91,5 | 0,9 |
| | 2,82 | 2,9 | 103,8 | 2,5 |
| | 5,63 | 6,2 | 110,1 | 3,2 |
| | 11,25 | 10,7 | 95,4 | 6,9 |
| | 22,50 | 22,4 | 99,4 | 2,6 |
| | 45,00 | 45,2 | 100,5 | 2,0 |
| Everolimus | 0,00 | - | - | - |
| | 1,41 | 1,3 | 95,6 | 0,7 |
| | 2,82 | 2,9 | 101,9 | 3,1 |
| | 5,63 | 6,1 | 107,6 | 5,6 |
| | 11,25 | 10,1 | 89,5 | 0,2 |
| | 22,50 | 24,2 | 107,5 | 10,6 |
| | 45,00 | 44,1 | 98,0 | 4,9 |

* n = 1

In Tabelle 30 sind die Ergebnisse der Bestimmung von dotierten Vollblutproben zu sehen.

Tabelle 30: Bestimmung der Richtigkeit: Analyse von Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus aus dotierten Vollblutproben; System; MD-SPE-Plattform im Triple-Kartuschen Modus nach in-line Prozessierung.

| | Konzentration dotiert [ng/mL] | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit [%] |
|---------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| Ciclosporin A | 0,00 | 0,0 | 0,0 |
| | 250,00 | 249,6 | 99,8 |
| | 500,00 | 501,2 | 100,2 |
| | 1.000,00 | 999,2 | 99,9 |
| Tacrolimus | 0,00 | 0,0 | 0,0 |
| | 10,00 | 9,5 | 94,6 |
| | 20,00 | 21,6 | 108,0 |
| | 40,00 | 38,9 | 97,3 |
| Sirolimus | 0,00 | 0,0 | 0,0 |
| | 11,25 | 22,3 | 197,9 |
| | 22,50 | 22,5 | 100,0 |
| | 45,00 | 45,0 | 100,0 |
| Everolimus | 0,00 | 0,0 | 0,0 |
| | 11,25 | 12,3 | 109,2 |
| | 22,50 | 19,4 | 86,1 |
| | 45,00 | 47,1 | 104,6 |

Die Richtigkeit der Bestimmung der Immunsuppressiva aus Vollblut mit der MD-SPE Methode (Triple-Kartuschen Modus) nach in-line Prozessierung ergab Werte im Bereich zwischen 94,6% und 109,2%. Die 197,9% bei 11,25ng/mL dotiertem Sirolimus wurden als Ausreißer gewertet. Die Richtigkeit der Bestimmung derselben Analyte aus Standardlösung ergab Werte im Bereich zwischen 89,5% und 114,9%. Bei dieser Messreihe konnte eine mit 1.000ng/mL Ciclosporin A dotierte Probe nicht ausgewertet werden. Die Präzision der einzelnen Messungen aus Standardlösung lag zwischen 0,2% und 12,7%.

Alle Ergebnisse liegen damit im Bereich der geforderten 15%-20% Standardabweichung. Es wird erwartet, dass eine hohe Präzision und Richtigkeit auch mit Hilfe eines geeigneten Probengebers über eine hohe Anzahl an Messungen nachzuweisen ist.

3.6.2 Selektivität und Spezifität

Selektivität ist die Fähigkeit einer analytischen Methode, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störungen zu erfassen (siehe Kapitel 3.3.4). Eine Methode ist spezifisch, wenn sie den oder die Analyte in Gegenwart anderer Substanzen in einer Probe ohne Verfälschung erfasst (siehe Kapitel 3.4.4).

3.6.3 Kalibration / Linearität und Linearitätsbereich

Die Linearität gibt den mathematischen Zusammenhang zwischen dem Messwert (Signal) und der Konzentration oder Menge an.

Die Validierung von Substanzen in biologischen Matrices erfolgt standardgemäß aus Matrixproben, die mit Kalibratorstandards (Referenzsubstanzen) dotiert werden. Zusätzlich werden Messungen von Qualitätskontrollen vorgenommen [132]. Um die Linearität der Methode und nicht nur die der Apparatur zu ermitteln, wurde der Test auf Linearität daher 1.) mit realen (dotierte Vollblutproben) und 2.) mit Standardproben (dotierte Proben in mobiler Phase [Methanol/10mmol Ammoniumacetat (80/20, v/v)] durchgeführt. Dafür durchliefen alle Proben die on-line MD-SPE Methode im Triple-Kartuschen Modus nach in-line Prozessierung. So wird auch der Einfluss der Matrix in die Linearitätsbestimmung mit einbezogen.

Um später auch Hinweise auf die Wiederfindungsraten im Vergleich zu der ersten SPE-Kartusche zu erhalten, wurden von den oben genannten dotierten Vollblutproben ebenfalls Eluate nach der ersten SPE-Kartusche (1,35mL) entnommen.

Die Linearität wird bei jeder Kalibrationsreihe aus mindestens drei verschiedenen Kalibrationsbereiche, die jeweils alle vier Analyte in verschiedenen Konzentrationen beinhalten, bestimmt. Ebenfalls erfolgte die Bestimmung eines Blindwertes. Dazu wurden die Proben mit den zu untersuchenden Analyten nach dem in Tabelle 31 dargestellten Schema dotiert. Um mögliche Fehler des Probengebers auszugleichen, wurden die drei Internen

Standards jedem Kalibrationsbereich in gleicher mittlerer therapeutischer Konzentration hinzugesetzt.

Tabelle 31: Kalibratoren: Konzentrationen der einzelnen Analyte in den sechs Kalibrationsbereichen.

| Level | Konzentration [ng/mL] | | | | | | |
|-------|-----------------------|-------|-------|-------|-----|------|------------|
| | CyA | Tacro | Sir | Eve | CyD | Asco | Desmethoxy |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 31,25 | 1,25 | 1,41 | 1,41 | 60 | 25 | 20 |
| 2 | 62,50 | 2,50 | 2,82 | 2,82 | 60 | 25 | 20 |
| 3 | 125,00 | 5,00 | 5,63 | 5,63 | 60 | 25 | 20 |
| 4 | 250,00 | 10,00 | 11,25 | 11,25 | 60 | 25 | 20 |
| 5 | 500,00 | 20,00 | 22,00 | 22,50 | 60 | 25 | 20 |
| 6 | 1.000,00 | 40,00 | 45,00 | 45,00 | 60 | 25 | 20 |

Von jeder Kalibrationsprobe wurden 25µL direkt injiziert und über die MD-SPE Plattform (Triple-Kartuschen Modus) nach in-line Prozessierung aufbereitet. Dabei wurde das Eluat der ersten (1,35mL) bzw. das der dritten SPE-Kartusche (1,8mL) aufgefangen, zur Trockene eingengt und in 100µL mobiler Phase resuspendiert. Die Ergebnisse einer dotierten Vollblutprobe zeigen Tabelle 32 und Tabelle 33. Die Ergebnisse einer dotierten Standardlösung sind in Tabelle 34 aufgeführt.

Massenspektrometrisch vermessen wurden aber jeweils nur 25µL (i.e. ein Viertel der ursprünglichen Probe). Für die Auswertung wurden die Verhältnisse der Peakflächen des jeweiligen Internen Standards mit den Peakflächen der Analyte berechnet. Die Kalibrationsgerade wurde über eine lineare Regression ermittelt, bei der die Konzentration 1/x gewichtet wurde.

Tabelle 32: Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten: Analyse der untersuchten Immunsuppressiva in Vollblut; Analysensystem: on-line MD-SPE Plattform (Triple-Kartuschen Modus) mit in-line Prozessierung; Probenentnahme: nach der ersten SPE-Kartusche.

| Konzentrationslevel : 0 - 6 | | | |
|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| | Kalibrationsbereich [ng/mL] | Kalibrationsgerade $y = ax + b$ | Korrelationskoeffizient |
| CyA | 31,25 - 1.000 | $y = 0,0246x - 0,2180$ | 0,9986 |
| Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,0290x + 0,0004$ | 0,9997 |
| Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,6150x - 0,8380$ | 0,9903 |
| Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 3,7800x - 2,0000$ | 0,9958 |

Tabelle 33: Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten: Analyse der untersuchten Immunsuppressiva in Vollblut; Analysensystem: on-line MD-SPE Plattform (Triple-Kartuschen Modus) mit in-line Prozessierung; Probenentnahme: nach der dritten SPE-Kartusche.

| Konzentrationslevel : 0 und 4 - 6 | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| | Kalibrationsbereich [ng/mL] | Kalibrationsgerade $y = ax + b$ | Korrelationskoeffizient |
| CyA | 250 - 1.000 | $y = 0,0335x - 1,9400$ | 1,0000 |
| Tacro | 10,00 - 40,00 | $y = 0,0244x + 0,0955$ | 0,9950 |
| Sir | 11,25 - 45,00 | $y = 0,8330x - 2,1996^*$ | 0,9833* |
| Eve | 11,25 - 45,00 | $y = 4,3800x - 20,0000$ | 0,9854 |

* berechnet aus Konzentrationslevel : 0, 4 und 6

Tabelle 34: Kalibrationsgeraden und Korrelationskoeffizienten: Analyse der untersuchten Immunsuppressiva in mobiler Phase (Methanol/10mmol Ammoniumacetat; 80/20, v/v); Analysensystem: on-line MD-SPE-Plattform (Triple-Kartuschen Modus) mit in-line Prozessierung; Probenentnahme: nach der dritten SPE-Kartusche.

| Konzentrationslevel : 0 - 6 | | | |
|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| | Kalibrationsbereich [ng/mL] | Kalibrationsgerade $y = ax + b$ | Korrelationskoeffizient |
| CyA | 31,25 - 1000 | $y = 0,0292x + 0,1970$ | 0,9959 |
| Tacro | 1,25 - 40 | $y = 0,0245x + 0,0000$ | 0,9970 |
| Sir | 1,41 - 45 | $y = 0,2750x + 0,0457$ | 0,9977 |
| Eve | 1,41 - 45 | $y = 2,0000x + 0,6920$ | 0,9974 |

Ein sehr hoher Korrelationskoeffizient (nahezu 1,0000) indiziert eine sehr gute Linearität. Die matrixfreien Kalibratoren der sechs verschiedenen Konzentrationsbereiche der Immunsuppressiva zeigen ein hohes Maß an Linearität. Auch die verschiedenen Kalibratoren der Immunsuppressiva in Vollblut ergeben ähnlich gute Korrelationswerte (sowohl nach der ersten als auch nach der dritten SPE-Kartusche).

3.6.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze wird durch die kleinste nachweisbare Menge oder Konzentration definiert. Sie ist als diejenige Analytkonzentration definiert, deren 95% Prognosebereich sich nicht mit dem Blindwert überschneidet.

Die Bestimmungsgrenze wird durch die kleinste quantifizierbare Menge oder Konzentration definiert. Sie ist definiert als diejenige Analytkonzentration, deren 95% Prognosebereich sich nicht mit dem 95% Prognosebereich des Blindwertes überschneidet.

Die Ermittlung der Nachweisgrenze erfolgte über die Berechnung der Analytkonzentration, bei der das Signal/Rausch-Verhältnis 3:1 beträgt. Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wird die Analytkonzentration bestimmt, bei der das Signal/Rausch-Verhältnis größer 10 ist.

Tabelle 35: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LLOQ): Bestimmung der Immunsuppressiva aus Vollblut mit der MD-SPE Plattform im Triple-Kartuschen Modus nach in-line Prozessierung.

| | LLOQ [ng/mL] | S/N am LLOQ | LOD [ng/mL] | theoretisch mögliches LLOQ [ng/mL] |
|-------|--------------|-------------|-------------|------------------------------------|
| CyA | 31,25 | 98,1 | 0,24 | 0,80 |
| Tacro | 1,25 | 42,5 | 0,02 | 0,07 |
| Sir | 1,41 | 22,8 | 0,05 | 0,15 |
| Eve | 1,41 | 207,6 | 0,01 | 0,02 |

Die geforderte Bestimmungsgrenze von 1ng/mL für Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus sowie 30ng/mL für Ciclosporin A wird mit der ausgearbeiteten Analysenplattform für alle Analyten erreicht.

Im Vergleich zu anderen Probenaufbereitungsmethoden (siehe Kapitel 3.7) wird mit der MD-SPE Probenaufbereitung im Triple-Kartuschen Modus nach in-line Prozessierung eine viel höhere Sensitivität erreicht. Diese hohe Sensitivität der Methode ist dem verbesserten Signal-/Rausch-Verhältnis zu verdanken. Durch die selektive Aufreinigung über drei verschiedene SPE-Kartuschenmaterialien, d.h. über eine multidimensionale SPE wird die Rauschintensität des Tandem-Massenspektrometers signifikant vermindert.

3.6.5 Robustheit

Eine Methode ist robust, wenn durch Variation der Testbedingungen das Endergebnis nicht oder nur unwesentlich verfälscht wird (siehe Kapitel 3.4.1).

3.6.6 Wiederfindung

Als Wiederfindung wird die Ausbeute nach allen Schritten der Analyse bezeichnet. Die Wiederfindungsrate eines Analyten mit einer Methode ist das Verhältnis des Signals eines Analyten in einer biologischen Probe nach Extraktion zum Signal ohne Extraktion. Die Wiederfindung muss nicht 100% betragen, jedoch sollte das Ausmaß konstant, präzise und wiederholbar sein.

Die Ermittlung der Wiederfindungsrate erfolgt durch die Vermessung der in Kapitel 3.6.3 beschriebenen Proben. Zusätzlich werden mit denselben Konzentrationen dotierte Standardlösungen mit oder ohne Aufbereitung (über die on-line MD-SPE im Triple Kartuschen Modus nach in-line Prozessierung) vermessen. Durch den Vergleich verschiedener Kalibrationskurven können nun mehrere Aussagen getroffen werden:

- Der Vergleich der on-line analysierten dotierten Vollblutprobe mit der on-line analysierten Standardlösung gibt Auskunft über die Matrixabhängigkeit der Wiederfindung (siehe Tabelle 36),
- Der Vergleich der on-line analysierten Standardprobe mit der direkt injizierten Standardprobe (off-line) repräsentiert den Analytverlust aufgrund von den SPE-Schritten (siehe Tabelle 37),
- Die Bestimmung der Analyte in den Eluatn der ersten bzw. der dritten SPE-Kartusche lässt Rückschlüsse über den Analytverlust während der MD-SPE Probenaufbereitung zu (siehe Tabelle 38).

Tabelle 36: Wiederfindungsraten (WFR): Analyse der untersuchten Immunsuppressiva in Abhängigkeit von der Matrix.

| | Konzentration dotiert [ng/mL] | Matrix-abhängige WFR [%] | Mittelwert [%] | Standardabw. [%] |
|---------------|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------|
| Ciclosporin A | 0,00 | - | 98,1 | 13,1 |
| | 250,00 | 112,2 | | |
| | 500,00 | 95,1 | | |
| | 1.000,00 | 87,0 | | |
| Tacrolimus | 0,00 | - | 98,4 | 4,8 |
| | 10,00 | 93,4 | | |
| | 20,00 | 102,7 | | |
| | 40,00 | 99,2 | | |
| Sirolimus | 0,00 | - | 136,6 | 48,4 |
| | 11,25 | 213,0 | | |
| | 22,50 | 98,8 | | |
| | 45,00 | 98,1 | | |
| Everolimus | 0,00 | - | 106,8 | 16,4 |
| | 11,25 | 121,9 | | |
| | 22,50 | 87,7 | | |
| | 45,00 | 110,7 | | |

Tabelle 37: Wiederfindungsrate (WFR). Analyse der untersuchten Immunsuppressiva in Abhängigkeit von den SPE-Schritten.

| | Konzentration dotiert [ng/mL] | WFR in Abhängigkeit von den SPE-Schritten [%] | Mittelwert [%] | Standardabw. [%] |
|---------------|-------------------------------------|---|-------------------|---------------------|
| Ciclosporin A | 0,00 | - | 92,9 | 24,0 |
| | 250,00 | 79,0 | | |
| | 500,00 | 81,0 | | |
| | 1.000,00 | 118,6 | | |
| Tacrolimus | 0,00 | - | 100,4 | 4,7 |
| | 10,00 | 96,1 | | |
| | 20,00 | 105,5 | | |
| | 40,00 | 99,6 | | |
| Sirolimus | 0,00 | - | 96,4 | 11,4 |
| | 11,25 | 85,1 | | |
| | 22,50 | 97,2 | | |
| | 45,00 | 107,0 | | |
| Everolimus | 0,00 | - | 91,6 | 10,6 |
| | 11,25 | 80,9 | | |
| | 22,50 | 93,9 | | |
| | 45,00 | 100,0 | | |

Tabelle 38: Wiederfindungsraten (WFR). Analyse der untersuchten Immunsuppressiva. Wiederfindung nach der 3. SPE-Kartusche bezogen auf das Eluat der 1. SPE-Kartusche.

| | Konzentration dotiert [ng/mL] | WFR 3. Kartusche (bezogen auf 1. Kartusche) [%] | Mittelwert [%] | Standardabw. [%] |
|---------------|-------------------------------------|---|-------------------|---------------------|
| Ciclosporin A | 0,00 | - | 88,4 | 16,8 |
| | 250,00 | 91,6 | | |
| | 500,00 | 72,3 | | |
| | 1.000,00 | 101,4 | | |
| Tacrolimus | 0,00 | - | 100,7 | 7,5 |
| | 10,00 | 95,9 | | |
| | 20,00 | 109,5 | | |
| | 40,00 | 96,8 | | |
| Sirolimus | 0,00 | - | 122,7 | 77,4 |
| | 11,25 | 228,8 | | |
| | 22,50 | 93,9 | | |
| | 45,00 | 45,5 | | |
| Everolimus | 0,00 | - | 89,9 | 28,5 |
| | 11,25 | 118,6 | | |
| | 22,50 | 81,6 | | |
| | 45,00 | 69,4 | | |

Die Ergebnisse der Wiederfindungsraten in Abhängigkeit von der Matrix und von SPE-Schritten zeigen eine nahezu 100%ige Wiederfindung. Bei der Berechnung der Wiederfindung in Abhängigkeit von der Matrix wird die mit 11,25ng/mL dotierten Sirolimusprobe als Ausreißer gewertet. Alle anderen Messwerte liegen im Bereich von 15 bzw. 20% Standardabweichung, sodass diesen Ergebnissen eine verlustfreie Bestimmung von Immunsuppressiva aus Vollblut mit der MD-SPE-POPLC Methode (Triple-Kartuschen Modus) nach in-line Prozessierung zu entnehmen ist. Bei der Wiederfindung in Abhängigkeit von den SPE-Schritten liegen die gemessenen Werte zum Teil knapp außerhalb des erlaubten Bereiches von bis zu 20% Standardabweichung.

Die Wiederfindungsrate der Analyte nach der dritten SPE-Kartusche bezogen auf die Wiederfindungsrate nach der 1. SPE-Kartusche zeigen ähnliche Tendenzen. Die Wiederfindung von Ciclosporin A, dem hydrophobsten Analyt, beträgt 88,4% bei 16,8% Standardabweichung. In der Umkehrphasenchromatographie eluieren hydrophobe Analyte später als hydrophile Analyte. Daher sollte der Transfer aller anderen Analyte unter den gegebenen Bedingungen ebenfalls vollständig sein. Dies wird bei Tacrolimus, dem hydrophilsten Analyten der untersuchten Analyten, bestätigt (WFR Mittelwert 100,7% bei 7,5% Standardabweichung). Sirolimus und Everolimus zeigen tendenziell nur eine 70-90%ige Wiederfindung. Sirolimus und der für diese beiden Substanzen gemeinsam genutzte Interne

Standard Desmethoxyiroliimus sind bekanntermaßen labile Substanzen. Daher muss an dieser Stelle vermutet werden, dass sie teilweise einem Zerfall unterlagen. Auch hier wurde die mit 11,25ng/mL dotierte Sirolimusprobe als Ausreißer gewertet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die multidimensionale on-line Extraktion verlustfrei ist. Darüber hinaus weist die Wiederfindung aus Vollblut einer der Wiederfindung aus Standardlösung vergleichbar hohe Wiederfindungsrate auf.

3.7 Partielles Kreuzvalidierungsverfahren

Um Vergleiche in Bezug auf die Leistungsstärke gängiger Aufbereitungsmethoden für die Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut zu erhalten, wurde ein partielles Kreuzvalidierungsverfahren durchgeführt. Die Kreuzvalidierung ist der Vergleich von Validierungsparametern von mindestens zwei bioanalytischen Methoden innerhalb derselben Studie oder zwischen zwei Studien [132]. In dieser Arbeit erfolgte der Vergleich verschiedener Validierungsparametern von folgenden Probenaufbereitungsmethoden nach den Vorgaben der FDA:

- Proteinpräzipitation von Vollblutproben gemäß Referenzbedingungen [261, 311],
- Proteinpräzipitation von CDB-Proben gemäß Referenzbedingungen [261, 311],
- Proteinpräzipitation von CDB(N₂)-Proben gemäß Referenzbedingungen [261, 311] und der
- Dried-Blood-Spot-Analyse (DBS) nach Hoogtanders et al. [312].

Als Referenzmethode wird die routinemäßig am Institut für Klinische Chemie, München, durchgeführte SPE-LC-MS/MS Methode nach off-line Probenaufbereitung durch Proteinpräzipitation eingesetzt [261, 311].

Die Herstellung von CDB erfolgte „at-line“ am Symbiosis™ Pharma Gerät. Die Vollblutproben wurden 16 Sekunden bei 75°C prozessiert. Die Herstellung der CDB(N₂)-Proben erfolgte, indem die entsprechenden Blutproben zweimal in flüssigem Stickstoff tiefgefroren

und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Die Proteinpräzipitation war gemäß Referenzbedingungen durch Vorlage von 150µL Fällungsreagenz in einem Reagiergefäß und anschließendem Zusatz von 150µL Probe durchzuführen. Die Gesamtprobe wurde mit einem Vortexer gut durchmischt. Danach rüttelten die Proben für fünf Minuten horizontal, bevor sie für 10 Minuten bei 16.000G zentrifugiert wurden. Das Fällungsreagenz enthielt abweichend von den oben angegebenen Literaturquellen alle drei Internen Standards in folgenden Konzentrationen: 120,7ng/mL Ciclosporin D, 48ng/mL Ascomycin und 38,5ng/mL Desmethoxysirolimus.

Die Dried-Blood-Spot-Analyse erfolgte in Anlehnung an bereits beschriebene DBS-Methoden für die Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut [312-315]. Daher wurden jeweils 30µL Vollblutprobe auf Whatman 903[®]-Filterkarten aufgetragen. Nach Trocknung über Nacht wurde ein im Durchmesser 7,5mm großer Stanzling gefertigt. Die Extraktion aus diesem Stanzling erfolgte in reinem Methanol für 60 Minuten auf einem Horizontalschüttler bei 800U/min. Dies weist von der Vorschrift von Hoogtanders et al. ab. Sie untersuchten nur Tacrolimus und extrahierten den Stanzling mit einem Lösemittelgemisch (Methanol/Acetonitril; 40/10, v/v). Darüber hinaus wurden dem Extraktionsreagenz entgegen der Vorschrift von Hoogtanders et al. alle drei Internen Standards in der Konzentration 1ng/mL hinzugefügt.

Alle Proben wurden bis zur LC-MS/MS Analyse vorbereitet (siehe Kapitel 3.6.). Die Messungen der Überstände der Proteinpräzipitate und der Extrakte der Dried-Blood-Spot Analyse erfolgten am Institut für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung, Nürnberg-Heroldsberg.

3.7.1 Richtigkeit und Präzision

Für die Berechnung der Richtigkeit, der Wiederholpräzision und der Wiederfindung erfolgte die Dotierung realer Matrixproben (Vollblut) mit drei verschiedenen therapeutischen Konzentrationen an Analyt bevor sie der jeweiligen Probenvorbereitung unterzogen wurden. Diese Konzentrationen wurden ähnlich den Konzentrationsbereichen 1, 4 und 6 der lyophilisierten Kalibratoren der Firma Recipe gewählt. Die Dotierung der Proben erfolgte mit

(31,25, 250 und 1.000ng/mL) Ciclosporin A, mit (1,25, 10 und 40ng/mL) Tacrolimus sowie jeweils mit (1,41, 11,25 und 45ng/mL) Sirolimus und Everolimus. Für die Bestimmung der Richtigkeit und der Präzision wurde von jeder Probe eine Fünfachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 39 - Tabelle 42 aufgeführt.

Tabelle 39: Richtigkeit und Präzision. Vermessung dotierter Vollblutproben (VB) routinemäßig im Institut für Klinische Chemie, München und eigene Kontrollmessung derselben Proben jeweils nach Proteinpräzipitation (PP).

| | therapeut. Bereich | Konzentration dotiert [ng/mL] | VB, PP in Routine vermessen | | | VB, PP | | |
|-------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit n = 5 [%] | Präzision n = 5 [%] | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit n = 5 [%] | Präzision n = 5 [%] |
| CyA | niedrig | 31,25 | 36,70 | 82,6 | 2,2 | 29,13 | 93,2 | 10,2 |
| | mittel | 250,00 | 261,91 | 95,2 | 2,6 | 233,25 | 93,3 | 6,0 |
| | hoch | 1.000,00 | 990,17 | 101,0 | 2,0 | 1067,00 | 106,7 | 14,6 |
| Tacro | niedrig | 1,25 | 1,27 | 98,3 | 5,4 | 1,25 | 100,1 | 7,0 |
| | mittel | 10,00 | 10,23 | 97,7 | 3,6 | 9,14 | 91,4 | 3,9 |
| | hoch | 40,00 | 38,97 | 102,6 | 2,2 | 40,60 | 101,5 | 5,9 |
| Sir | niedrig | 1,41 | 1,45 | 96,8 | 5,4 | 1,30 | 92,2 | 8,6 |
| | mittel | 11,25 | 11,89 | 94,3 | 3,6 | 11,93 | 106,0 | 3,7 |
| | hoch | 45,00 | 44,08 | 102,1 | 2,1 | 48,24 | 107,2 | 1,2 |
| Eve | niedrig | 1,41 | 1,50 | 93,8 | 3,5 | 1,49 | 105,7 | 5,6 |
| | mittel | 11,25 | 12,00 | 93,4 | 0,9 | 12,03 | 106,9 | 3,0 |
| | hoch | 45,00 | 44,34 | 101,5 | 0,8 | 45,09 | 100,2 | 3,6 |

Tabelle 40: Richtigkeit und Präzision. Vermessung einer CDB-Probe und einer CDB(N₂)-Probe jeweils nach Proteinpräzipitation (PP).

| | therapeut. Bereich | Konzentration dotiert [ng/mL] | CDB-Probe, PP | | | CDB(N ₂)-Probe | | |
|-------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit n = 5 [%] | Präzision n = 5 [%] | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit n = 5 [%] | Präzision n = 5 [%] |
| CyA | niedrig | 31,25 | 32,88 | 105,2 | 4,1 | 31,38 | 100,4 | 2,7 |
| | mittel | 250,00 | 256,75 | 102,7 | 1,6 | 198,25 | 79,3 | 0,7 |
| | hoch | 1.000,00 | 970,00 | 97,0 | 0,7 | 945,00 | 95,4 | 1,8 |
| Tacro | niedrig | 1,25 | 1,19 | 95,5 | 7,8 | 1,32 | 106,1 | 3,2 |
| | mittel | 10,00 | 10,10 | 101,0 | 10,1 | 7,91 | 79,1 | 1,1 |
| | hoch | 40,00 | 38,44 | 96,1 | 4,7 | 40,60 | 101,5 | 1,8 |
| Sir | niedrig | 1,41 | 1,45 | 102,8 | 5,2 | 1,46 | 103,8 | 4,6 |
| | mittel | 11,25 | 12,81 | 113,9 | 2,2 | 8,09 | 71,9 | 4,3 |
| | hoch | 45,00 | 43,43 | 96,5 | 2,3 | 42,44 | 97,3 | 3,4 |
| Eve | niedrig | 1,41 | 1,17 | 83,4 | 4,3 | 1,26 | 89,9 | 2,9 |
| | mittel | 11,25 | 12,51 | 111,2 | 1,1 | 8,92 | 79,3 | 1,6 |
| | hoch | 45,00 | 38,97 | 86,6 | 1,8 | 42,93 | 95,4 | 1,7 |

Tabelle 41: Richtigkeit und Präzision. Vermessung einer dotierten Standardlösung (Std.-Lsg.) und einer dotierten Standardlösung (Std.-Lsg.) nach Proteinpräzipitation (PP).

| | therapeut. Bereich | Konzentration dotiert [ng/mL] | Std.-Lsg | | | Std.-Lsg, PP | | |
|-------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit n = 5 [%] | Präzision n = 5 [%] | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit n = 5 [%] | Präzision n = 5 [%] |
| CyA | niedrig | 31,25 | 28,97 | 92,7 | 0,8 | 28,16 | 90,1 | 2,0 |
| | mittel | 250,00 | 282,00 | 112,8 | 0,8 | 286,50 | 114,6 | 1,1 |
| | hoch | 1.000,00 | 966,00 | 96,6 | 2,2 | 952,00 | 95,2 | 4,5 |
| Tacro | niedrig | 1,25 | 1,23 | 98,0 | 2,3 | 1,21 | 96,8 | 1,6 |
| | mittel | 10,00 | 10,59 | 105,9 | 0,5 | 10,29 | 102,9 | 1,1 |
| | hoch | 40,00 | 39,44 | 98,6 | 0,7 | 38,36 | 95,9 | 1,2 |
| Sir | niedrig | 1,41 | 1,18 | 84,0 | 2,5 | 1,28 | 90,7 | 7,1 |
| | mittel | 11,25 | 12,27 | 109,1 | 2,2 | 12,17 | 108,2 | 2,1 |
| | hoch | 45,00 | 42,84 | 95,2 | 1,9 | 42,21 | 83,8 | 2,2 |
| Eve | niedrig | 1,41 | 1,21 | 86,2 | 1,5 | 1,13 | 80,4 | 1,7 |
| | mittel | 11,25 | 12,53 | 111,4 | 0,9 | 12,48 | 110,9 | 1,8 |
| | hoch | 45,00 | 43,29 | 96,2 | 1,5 | 43,16 | 95,9 | 2,5 |

Grundsätzlich liegen fast alle routinemäßig vom Institut für Klinische Chemie, München und selbst vermessenen Vollblut-, CDB-, CDB(N₂)- und Standardlösungs-Proben im geforderten 0-15% bzw. 20%-igen Abweichungsintervall und sind daher richtig. Nur die mit mittlerer therapeutischer Konzentration dotierte CDB(N₂)-Probe liegt bei allen Analyten um 20% zu niedrig. Dies deutet auf einen systematischen Fehler hin, der bei der Dotierung der Gesamtprobe zu suchen ist. Alle genannten Probenaufbereitungsverfahren erfüllen darüber hinaus die Präzisionskriterien der FDA. Dennoch können erhebliche Unterschiede herausgearbeitet werden: dotierte Proben aus Standardlösung zeigen erwartungsgemäß eine hohe Präzision über alle Konzentrationsbereiche. Die routinemäßig vermessenen Vollblutproben weisen im Vergleich zu den selbst vermessenen dotierten Vollblutproben eine höhere Präzision auf. Dies ist auf weniger Pipettierschritte zurückzuführen. Beim Vergleich der Präzisionen der CDB-Proben mit den CDB(N₂)-Proben, deutet die höhere Präzision der CDB(N₂)-Proben auf eine homogenere und stärker abgereicherte Matrix hin.

Tabelle 42: Richtigkeit und Präzision. Vermessung der Dried-Blood-Spot-Analyse von 1.) dotierten Vollblutproben, 2.) ClinCal[®]-Proben und 3.) Proben aus dotierter Standardlösung.

| | therapeut. Bereich | Konzentration dotiert [ng/mL] | VB mit DBS-Methode | | | ClinCal [®] mit DBS-Methode | | | Std.-Lsg. mit DBS-Methode | | |
|-------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit n = 5 [%] | Präzision n = 5 [%] | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit n = 5 [%] | Präzision n = 5 [%] | Konzentration berechnet [ng/mL] | Richtigkeit n = 5 [%] | Präzision n = 5 [%] |
| Cya | niedrig | 31,25 | 13,88 | 44,0 | 31,3 | 193,75 | 620,0 | 0,7 | 108,63 | 347,6 | 3,5 |
| | mittel | 250,00 | 158,50 | 63,4 | 3,1 | 275,55 | 110,2 | 0,7 | 247,75 | 99,1 | 1,6 |
| | hoch | 1.000,00 | 1.012,00 | 101,2 | 4,9 | 1.065,00 | 106,5 | 0,7 | 1039 | 103,9 | 10,3 |
| Tacro | niedrig | 1,25 | 0,80 | 64,1 | 48,3 | 0,96 | 76,7 | 31,4 | n.d. | - | - |
| | mittel | 10,00 | 5,69 | 56,9 | 9,2 | 10,97 | 109,7 | 7,0 | 8,74 | 87,4 | 4,8 |
| | hoch | 40,00 | 38,08 | 95,2 | 4,4 | 41,00 | 102,5 | 2,7 | 38,4 | 96,0 | 1,8 |
| Sir | niedrig | 1,41 | 1,59 | 113,0 | 16,5 | 0,86 | 60,8 | 19,6 | n.d. | - | - |
| | mittel | 11,25 | 7,93 | 70,5 | 8,2 | 11,37 | 101,1 | 3,0 | 10,92 | 97,1 | 9,1 |
| | hoch | 45,00 | 38,48 | 85,5 | 8,2 | 48,06 | 106,8 | 7,8 | 39,78 | 88,4 | 2,6 |
| Eve | niedrig | 1,41 | 1,49 | 105,6 | 7,4 | 1,32 | 93,9 | 10,4 | 2,09 | 148,9 | 7,0 |
| | mittel | 11,25 | 7,76 | 69,0 | 8,0 | 11,50 | 102,7 | 5,7 | 9,77 | 86,8 | 6,1 |
| | hoch | 45,00 | 30,74 | 88,3 | 5,8 | 46,34 | 103,1 | 6,9 | 41,18 | 91,5 | 3,1 |

Die Richtigkeit aller Proben, die nach der DBS-Methode analysiert wurden, muss nach den erhaltenen Ergebnissen in Frage gestellt werden. Sie fallen zum Teil erheblich aus dem Toleranzbereich heraus. Bemerkenswert ist jedoch die gute Präzision in den höheren Konzentrationsbereichen. Als erheblicher Nachteil dieser Methode konnte die sehr gering gewählte Konzentration an Internem Standard identifiziert werden.

Zusätzlich wurde für die Matrix CDB eine Wiederholpräzision bestimmt. Dafür wurde eine Dreifachbestimmung der oben beschriebenen Proben an vier aufeinander folgenden Tagen durchgeführt (siehe Tabelle 43).

Tabelle 43: Wiederholpräzision. Probe: CDB nach Proteinpräzipitation (PP).

| | Konzentrations- bereich [ng/mL] | Tag 1 Standardabw. n = 3 [%] | Tag 2 Standardabw. n = 3 [%] | Tag 3 Standardabw. n = 3 [%] | Tag 4 Standardabw. n = 3 [%] | gesamt Standardabw. [%] |
|---------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| Ciclosporin A | 31,25 | 1,92 | 2,34 | 2,04 | 1,59 | 1,97 |
| | 62,50 | 4,00 | 5,70 | 2,99 | 0,25 | 3,24 |
| | 125,00 | 3,53 | 1,24 | 1,57 | 0,87 | 1,80 |
| | 250,00 | 2,45 | 1,73 | 0,88 | 3,49 | 2,14 |
| | 500,00 | 6,59 | 2,11 | 5,55 | 0,95 | 3,80 |
| | 1000,00 | 0,63 | 2,80 | 2,57 | 0,68 | 1,67 |
| Tacrolimus | 31,25 | 16,71 | 1,73 | 1,77 | 7,0 | 6,81 |
| | 62,50 | 7,13 | 3,80 | 22,40 | 4,6 | 9,49 |
| | 125,00 | 6,23 | 3,65 | 11,64 | 2,1 | 5,91 |
| | 250,00 | 6,02 | 9,12 | 4,58 | 3,4 | 5,78 |
| | 500,00 | 3,93 | 4,21 | 2,31 | 2,5 | 3,24 |
| | 1000,00 | 0,49 | 2,29 | 2,55 | 1,4 | 1,67 |
| Sirolimus | 1,41 | 5,48 | 14,00 | 7,51 | 2,07 | 7,27 |
| | 2,81 | 9,20 | 8,99 | 7,22 | 2,13 | 6,89 |
| | 5,63 | 0,86 | 3,68 | 3,65 | 0,43 | 2,16 |
| | 11,25 | 4,44 | 6,78 | 5,98 | 2,46 | 4,92 |
| | 22,50 | 1,44 | 0,63 | 12,18 | 0,72 | 3,74 |
| | 45,00 | 4,20 | 5,26 | 2,82 | 1,22 | 3,38 |
| Everolimus | 1,41 | 0,47 | 0,48 | 0,06 | 0,99 | 0,50 |
| | 2,81 | 3,54 | 1,04 | 2,93 | 1,26 | 2,19 |
| | 5,63 | 3,26 | 4,60 | 4,88 | 1,57 | 3,58 |
| | 11,25 | 1,32 | 4,63 | 0,58 | 0,28 | 1,70 |
| | 22,50 | 1,41 | 2,11 | 1,16 | 0,41 | 1,27 |
| | 45,00 | 3,76 | 1,95 | 3,29 | 1,15 | 2,54 |

Die Wiederholpräzision aller Analyte aus CDB liegt innerhalb des geforderten 15% (bzw. 20%)-igen Abweichungsintervalls. Ebenfalls liegen alle Präzisionswerte innerhalb eines Tages zwischen den geforderten Grenzen. Die 22,40% für die mit 62,50ng/mL dotierte Tacrolimus Probe am 3. Tag wird als Ausreißer gewertet. Auffallend ist die hohe Gesamtpräzision. Alle untersuchten Analyte weisen über den gesamten therapeutischen Bereich Standardabweichungen unter 10% auf.

3.7.2 Kalibration, Linearität und Linearitätsbereich

Die Beziehung zwischen der Konzentration an Analyt und dem Messwert wird über die Linearität bestimmt (siehe Kapitel 3.6.3).

Die Linearität wird aus einer Kalibrationsreihe bestehend aus sechs verschiedenen Kalibrationsbereichen, für den jeweiligen Analyt, berechnet. Darüber hinaus ist die Ermittlung eines Blindwertes erforderlich. Die Dotierung der Vollblutproben erfolgten dem in Tabelle 31 dargestellten Schema. Die drei Internen Standards wurden jeweils in mittlerer therapeutischer Konzentration über das Präzipitations- bzw. das Extraktionsreagenz hinzugefügt. Für die Berechnung der Wiederfindungsraten erfolgte zusätzlich die Bestimmung einer dotierten Standardlösung. Als Referenzwerte wurden Messwerte des Institutes für Klinische Chemie, München für dotierte Vollblutproben verschiedener Konzentrationsbereiche nach Proteinpräzipitation herangezogen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigt Tabelle 44.

Alle untersuchten Probenaufbereitungsmethoden für die Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut zeigen eine hohe Proportionalität zwischen dem Messsignal und der Konzentration der Analyte. Auffällig ist hierbei, dass die Proben, die nach der DBS-Methode untersucht worden sind, größeren Schwankungen unterliegen. Aus diesem Grund wurden weniger Kalibrationspunkte bei der Ermittlung der Geradengleichung berücksichtigt.

Tabelle 44: Kalibrationsgeraden, Kalibrationsbereich, und Korrelationskoeffizienten: Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut nach verschiedenen Probenaufbereitungsmethoden.

| | | Kalibrationsbereich [ng/mL] | Geradengleichung $y = ax + b$ | Kalibrationspunkte der Geradengleichung | Korrelationskoeffizient |
|---|-------|--------------------------------|----------------------------------|--|-------------------------|
| dotierte VB - Probe mit anschl. PP (Referenz) | CyA | 31,25 - 1.000,00 | $y = 0,4773x + 0,0342$ | 6 | 0,9994 |
| | Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,3279x + 0,0011$ | 6 | 0,9994 |
| | Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,4977x + 0,0114$ | 6 | 0,9984 |
| | Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 5,2871x + 0,1102$ | 6 | 0,9963 |
| dotierte VB - Probe mit anschl. PP | CyA | 31,25 - 1.000,00 | $y = 0,0480x + 0,0147$ | 5 | 0,9978 |
| | Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,0132x + 0,0127$ | 5 | 0,9995 |
| | Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,0454x + 0,0238$ | 5 | 0,9969 |
| | Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 0,4900x + 0,0721$ | 5 | 0,9989 |
| lyophilisierte ClinCa I - Probe mit anschl. PP | CyA | 24,30 - 1.345,00 | $y = 0,0052x - 0,0432$ | 6 | 0,9988 |
| | Tacro | 1,22 - 39,70 | $y = 0,0211x + 0,0108$ | 6 | 0,9976 |
| | Sir | 1,38 - 44,30 | $y = 0,0666x + 0,0193$ | 6 | 0,9985 |
| | Eve | 1,20 - 44,90 | $y = 0,0753x - 0,0013$ | 6 | 0,9998 |
| dotierte Std. - Probe mit anschl. PP | CyA | 31,25 - 1.000,00 | $y = 0,0197x + 0,0583$ | 5 | 0,9979 |
| | Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,0317x + 0,0014$ | 6 | 0,9990 |
| | Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,1640x + 0,0404$ | 6 | 0,9975 |
| | Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 1,2300x + 0,4340$ | 6 | 0,9968 |
| dotierte Std. - Probe | CyA | 31,25 - 1.000,00 | $y = 0,0214x + 0,0335$ | 5 | 0,9974 |
| | Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,0296x + 0,0008$ | 6 | 0,9994 |
| | Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,1490x + 0,0762$ | 6 | 0,9976 |
| | Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 1,0900x + 0,5460$ | 6 | 0,9968 |
| dotierte CDB - Probe mit anschl. PP | CyA | 31,25 - 1.000,00 | $y = 0,0041x - 0,0536$ | 5 | 0,9979 |
| | Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,0095x + 0,0134$ | 5 | 0,9985 |
| | Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,0474x + 0,0083$ | 5 | 0,9991 |
| | Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 0,4290x + 0,0238$ | 5 | 0,9967 |
| dotierte CDB(N ₂) - Probe mit anschl. PP | CyA | 31,25 - 1.000,00 | $y = 0,0052x - 0,0162$ | 5 | 0,9988 |
| | Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,0111x - 0,0033$ | 5 | 0,9987 |
| | Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,0688x - 0,0688$ | 5 | 0,9978 |
| | Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 0,5140x - 0,0818$ | 5 | 0,9938 |
| dotierte DBS - Probe mit anschl. Extraktion | CyA | 31,25 - 1.000,00 | $y = 0,0027x + 0,0233$ | 4 | 0,9992 |
| | Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,0423x + 0,0379$ | 3 | 0,9983 |
| | Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,1830x + 0,0591$ | 4 | 0,9982 |
| | Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 1,3800x + 0,4680$ | 4 | 0,9967 |
| dotierte ClinCaI - Probe nach DBS-Methode mit anschl. Extraktion | CyA | 31,25 - 1.000,00 | $y = 0,0040x - 0,7360$ | 3 | 0,9822 |
| | Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,0483x + 0,0168$ | 6 | 0,9972 |
| | Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,1460x + 0,0882$ | 6 | 0,9969 |
| | Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 0,1600x + 0,0716$ | 6 | 0,9956 |
| dotierte Std. - Probe nach DBS-Methode mit anschl. Extraktion | CyA | 31,25 - 1.000,00 | $y = 0,0003x - 0,0220$ | 3 | 0,9992 |
| | Tacro | 1,25 - 40,00 | $y = 0,0150x + 0,0073$ | 4 | 0,9964 |
| | Sir | 1,41 - 45,00 | $y = 0,0504x - 0,0877$ | 3 | 0,9992 |
| | Eve | 1,41 - 45,00 | $y = 0,3860x - 0,3530$ | 4 | 0,9980 |

Es erfolgte die Bestimmung folgender Kalibrationsgeraden aus denen später die Wiederfindung berechnet wurde:

1. Für die Vollblutproben mit anschließender Proteinpräzipitation:

- Dotierte Vollblutproben (gemessen im Institut für Klinische Chemie, München)

- Dotierter Vollblutproben (eigene Messungen)
- Lyophilisierte ClinCal Proben
- Standardlösung

2. Für die CDB-Proben mit anschließender Proteinpräzipitation:

- Dotierter CDB-Proben
- Standardlösung

3. Für die CDB(N₂)-Proben mit anschließender Proteinpräzipitation:

- Dotierte CDB(N₂)-Proben
- Standardlösung

4. Für die Dried-Blood-Spot-Proben mit anschließender Extraktion:

- Dotierter Vollblutproben
- Lyophilisierte ClinCal[®] Proben
- Standardlösung aufgetragen auf Filterpapier

Alle Proben wurden mit demselben instrumentellen Aufbau gemessen. Daher können die Steigungen der verschiedenen Kalibrationsgeraden miteinander verglichen werden. Dabei gilt: je steiler die Steigung, desto sensitiver die Methode. Erwartungsgemäß zeigen Proben, die aus Standardlösung gemessen wurden, die höchste Sensitivität. Im Allgemeinen zeigen Proben aus der CDB(N₂)-Matrix eine höhere Sensitivität als Proben aus der CDB-Matrix. Im Vergleich zu Proben aus Vollblut weisen die Proben jedoch keinen großen Unterschied auf. Da in diesem Falle nur die Matrices, aus denen gemessen worden ist, variiert wurden, ist eine sensitivere Methode gleichbedeutend mit einer homogenen und abgereicherten Matrix. Im Tandem-Massenspektrometer werden somit weniger Matrixeffekte erwartet.

3.7.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Ergebnisse der Nachweis- und Bestimmungsgrenze zeigt Tabelle 45.

Tabelle 45: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LLOQ). Bestimmung der Immunsuppressiva aus Vollblut nach verschiedenen Probenaufbereitungsmethoden.

| | | Niedrigster Kalibrations- punkt mit S/N ≥ 3 [ng/mL] | S/N am niedrigsten Kalibrationspunkt mit S/N ≥ 3 | (theoretisch mögliches) LOD [ng/mL] | (theoretisch mögliches) LLOQ [ng/mL] |
|---|-------|--|---|--|---|
| dotierte VB - Probe mit anschl. PP (Referenz) | CyA | 31,25 | 57,5 | (1,63) | (5,43) |
| | Tacro | 1,25 | 13,4 | (0,28) | (0,93) |
| | Sir | 1,41 | 4,8 | (0,89) | 2,82 |
| | Eve | 1,41 | 60,3 | (0,07) | (0,23) |
| dotierte VB - Probe mit anschl. PP | CyA | 31,25 | 38,0 | (2,47) | (8,22) |
| | Tacro | 1,25 | 4,8 | (0,78) | 2,60 |
| | Sir | 1,41 | 21,9 | (0,19) | (0,64) |
| | Eve | 1,41 | 89,6 | (0,05) | (0,16) |
| lyophilisierte ClinCal - Probe mit anschl. PP | CyA | 24,30 | 38,2 | (1,91) | (6,36) |
| | Tacro | 1,22 | 5,8 | (0,63) | 2,10 |
| | Sir | 1,38 | 14,5 | (0,29) | (0,95) |
| | Eve | 1,22 | 74,9 | (0,05) | (0,16) |
| dotierte Std. - Probe mit anschl. PP | CyA | 31,25 | 266,7 | (0,35) | (1,17) |
| | Tacro | 1,25 | 121,5 | (0,03) | (0,10) |
| | Sir | 1,41 | 144,2 | (0,03) | (0,10) |
| | Eve | 1,41 | 1.032,1 | (0,00) | (0,01) |
| dotierte Std. - Probe | CyA | 31,25 | 178,5 | (0,53) | (1,75) |
| | Tacro | 1,25 | 91,1 | (0,04) | (0,14) |
| | Sir | 1,41 | 121,5 | (0,03) | (0,12) |
| | Eve | 1,41 | 266,8 | (0,02) | (0,05) |
| dotierte CDB - Probe mit anschl. PP | CyA | 31,25 | 25,2 | (3,72) | (12,4) |
| | Tacro | 1,25 | 5,1 | (0,74) | 2,45 |
| | Sir | 1,41 | 10,9 | (0,39) | (1,29) |
| | Eve | 1,41 | 76,7 | (0,06) | (0,18) |
| dotierte CDB(N ₂) - Probe mit anschl. PP | CyA | 31,25 | 100,6 | (0,93) | (3,11) |
| | Tacro | 1,25 | 12,2 | (0,31) | (1,02) |
| | Sir | 1,41 | 28,6 | (0,15) | (0,49) |
| | Eve | 1,41 | 121,0 | (0,03) | (0,12) |
| dotierte DBS - Probe mit anschl. Extraktion | CyA | 31,25 | 5,2 | (18,03) | 60,10 |
| | Tacro | 5,63 | 5,9 | 2,86 | 9,54 |
| | Sir | 2,81 | 6,5 | (1,3) | 4,32 |
| | Eve | 1,41 | 8,6 | (0,49) | 1,64 |
| dotierte ClinCal - Probe nach DBS-Methode mit anschl. Extraktion | CyA | 31,25 | 4,7 | (19,95) | 66,49 |
| | Tacro | 2,50 | 6,1 | (1,23) | 4,10 |
| | Sir | 2,81 | 5,9 | 1,43 | 4,76 |
| | Eve | 2,81 | 4,4 | 1,92 | 6,39 |
| dotierte Std. - Probe nach DBS-Methode mit anschl. Extraktion | CyA | 31,25 | 3,4 | 27,57 | 91,91 |
| | Tacro | 2,50 | 3,3 | 2,27 | 7,58 |
| | Sir | 5,63 | 4,7 | 3,59 | 11,98 |
| | Eve | 1,41 | 3,3 | (1,28) | 4,27 |

() Wert liegt unter dem niedrigsten Kalibrationspunkt und wurde berechnet mit S/N = 3 für Detektionsgrenzen und S/N = 10 für Bestimmungsgrenzen

Die Ermittlung der Nachweisgrenze erfolgte über die Berechnung der Analytkonzentration, bei der das Signal/Rausch-Verhältnis 3:1 beträgt. Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wird die Analytkonzentration bestimmt, bei der das Signal/Rausch-Verhältnis größer als 10 ist. Für alle Proben, die am niedrigsten Kalibrationspunkt ein Signal/Rausch-Verhältnis größer als 3 bzw. 10 aufwiesen, wurde ein theoretisch mögliches Detektions- bzw. Quantifizierungs-limit errechnet. Diese Grenzen können gegebenenfalls mit entsprechenden Realproben verifiziert werden. Aus Standardlösung wird die geforderte Bestimmungsgrenze von 1ng/mL wird für alle drei schwieriger zu analysierenden Analyte (Sirolimus, Everolimus und Tacrolimus) erreicht.

Dagegen erreicht keine Probe, die nach der DBS-Methode aufbereitet worden ist, das Quantifizierungs-limit im unteren therapeutischen Bereich der Analyte. Für alle anderen Aufbereitungsmethoden ist die Quantifizierung von Ciclosporin A bis in die niedrigen therapeutischen Bereiche unproblematisch. Jedoch zeigten nur die CDB(N₂)-Proben ein theoretisch mögliches Quantifizierungs-limit von 1ng/mL für Sirolimus, Everolimus und Tacrolimus.

3.7.4 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate beschreibt die Ausbeute der Probenaufbereitung. Die Ermittlung der Wiederfindungsrate erfolgt durch die Vermessung der in Kapitel 3.7.2 beschriebenen Proben. Durch den Vergleich verschiedener Kalibrationsgeraden können nun folgende Aussagen getroffen werden:

- Für die Vollblutproben mit anschließender Proteinpräzipitation:
Der Vergleich einer Realprobe mit einer ClinCal[®]- bzw. einer Standardlösung gibt Auskunft über die Matrixabhängigkeit der Wiederfindung (siehe Tabelle 46).

- Für die CDB-Proben und die CDB(N₂)-Proben mit anschließender Proteinpräzipitation:
Der Vergleich einer Realprobe mit einer Standardlösung gibt Auskunft über die Matrixabhängigkeit der Wiederfindung (siehe Tabelle 47).
- Für die Dried-Blood-Spot-Proben mit anschließender Extraktion:
Der Vergleich der Realprobe mit der ClinCal[®]-Probe bzw. mit der Standardlösung gibt Auskunft über die Matrixabhängigkeit der Wiederfindung (siehe Tabelle 48).

Tabelle 46: Wiederfindungsraten (WFR): Vergleich der Wiederfindungsraten aus Vollblut nach Proteinpräzipitation (PP), Standardlösung und präzipitierten ClinCal[®]-Kalibratoren.

| | Konzentration [ng/mL] | WFR aus dotiertem VB PP* n = 3 [%] | Standardabw. n = 3 [%] | WFR aus dotiertem VB PP ** n = 3 [%] | Standardabw. n = 3 [%] |
|-------|--------------------------|--|------------------------------|--|------------------------------|
| CyA | 31,25 | 109,3 | 7,1 | 145,9 | 6,6 |
| | 250,00 | 86,2 | 2,8 | 188,8 | 1,1 |
| | 1.000,00 | 104,5 | 6,5 | 51,4 | 5,1 |
| Tacro | 1,25 | 107,0 | 7,3 | 92,9 | 10,3 |
| | 10,00 | 88,3 | 3,5 | 88,2 | 2,3 |
| | 40,00 | 101,7 | 3,5 | 104,8 | 2,5 |
| Sir | 1,41 | 106,5 | 8,1 | 88,1 | 10,9 |
| | 11,25 | 99,9 | 3,4 | 118,2 | 1,7 |
| | 45,00 | 108,3 | 7,3 | 94,0 | 2,8 |
| Eve | 1,41 | 121,0 | 8,3 | 125,5 | 7,6 |
| | 11,25 | 94,2 | 3,4 | 108,5 | 1,9 |
| | 45,00 | 105,4 | 3,5 | 97,5 | 2,7 |

* Standardlösung gelöst in Proteinpräzipitationsreagenz = 100%

** Überstand einer proteinpräzipitierten ClinCal[®]-Probe = 100%

Tabelle 47: Wiederfindungsraten (WFR): Vergleich der Wiederfindungsraten aus CDB, CDB(N₂) jeweils nach Proteinpräzipitation (PP) und Standardlösung.

| | Konzentration [ng/mL] | WFR aus CDB PP* n = 3 [%] | Standardabw. n = 3 [%] | WFR aus CDB(N ₂) PP* n = 3 [%] | Standardabw. n = 3 [%] |
|-------|--------------------------|---------------------------------|------------------------------|--|------------------------------|
| CyA | 31,25 | 122,8 | 0,8 | 115,0 | 2,1 |
| | 250,00 | 89,6 | 0,5 | 69,7 | 2,0 |
| | 1.000,00 | 102,7 | 4,9 | 101,9 | 6,4 |
| Tacro | 1,25 | 102,8 | 4,7 | 108,6 | 3,2 |
| | 10,00 | 101,4 | 12,4 | 76,6 | 1,7 |
| | 40,00 | 103,3 | 4,3 | 103,7 | 3,1 |
| Sir | 1,41 | 114,4 | 9,4 | 113,0 | 2,9 |
| | 11,25 | 103,7 | 2,6 | 68,4 | 3,4 |
| | 45,00 | 100,8 | 2,4 | 102,4 | 1,6 |
| Eve | 1,41 | 98,9 | 5,0 | 109,6 | 6,3 |
| | 11,25 | 100,0 | 1,5 | 71,5 | 0,5 |
| | 45,00 | 92,8 | 6,5 | 99,4 | 1,0 |

* Standardlösung gelöst in Proteinpräzipitationsreagenz = 100%

Tabelle 48: Wiederfindungsraten (WFR): Vergleich der Wiederfindungsraten aus DBS, einer Standardlösung als DBS und aus ClinCal[®] Kalibratoren als DBS.

| | Konzentration [ng/mL] | WFR aus dotierten DBS* n = 3 [%] | Standardabw. n = 3 [%] | WFR aus dotierten DBS** n = 3 [%] | Standardabw. n = 3 [%] |
|-------|--------------------------|--|------------------------------|---|------------------------------|
| CyA | 31,25 | 23,7 | 66,7 | 17,2 | 56,6 |
| | 250,00 | 63,4 | 3,4 | 75,9 | 2,5 |
| | 1.000,00 | 103,4 | 5,9 | 70,7 | 6,3 |
| Tacro | 1,25 | n.a. | - | 67,3 | 14,2 |
| | 10,00 | 62,0 | 10,5 | 51,2 | 4,0 |
| | 40,00 | 95,8 | 6,6 | 94,7 | 2,8 |
| Sir | 1,41 | n.a. | - | 162,2 | 5,9 |
| | 11,25 | 73,2 | 7,1 | 67,4 | 3,0 |
| | 45,00 | 94,0 | 5,3 | 83,9 | 3,2 |
| Eve | 1,41 | 70,4 | 17,0 | 126,3 | 7,6 |
| | 11,25 | 81,4 | 3,9 | 72,4 | 2,8 |
| | 45,00 | 93,0 | 1,9 | 88,2 | 3,0 |

n.a. = nicht auswertbar

* Standardlösung nach DBS-Methode aufbereitet = 100%

** ClinCal[®]-Kalibratoren nach DBS-Methode aufbereitet = 100%

Die Bestimmung der Wiederfindung der untersuchten Analyte aus präzipitiertem Vollblut ergab für den gesamten therapeutischen Bereich eine 100% Wiederfindungsrate. Darüber hinaus liegen sie alle innerhalb des 15- bzw. 20%igen Abweichungsintervalls. Die mit 1,4ng/mL Everolimus dotierte Probe wurde als Ausreißer gewertet. Dagegen variieren die

Wiederfindungsraten bezogen auf den Überstand einer präzipitierten ClinCal[®]-Probe mit Werten zwischen 51-188%. Obwohl die lyophilisierte Matrix zum Teil sehr hohe Präzisionswerte zeigt, ist festzustellen, dass sich die ClinCal[®]-Proben eher schlecht als Referenzmaterial eignen.

Für die Wiederfindungsraten von präzipitierten CDB- und CDB(N₂)-Proben bezogen auf eine präzipitierte Standardlösung gilt das Gleiche wie für die Vollblutprobe. Sie weisen 100%ige Wiederfindungsraten auf. Die Wiederfindungen aus CDB und CDB(N₂) sind daher mit Vollblut vergleichbar. Die mit 31,25ng/mL Ciclosporin A dotierte Probe wurde für die Matrix CDB als Ausreißer gewertet. Die Präzision aller Proben liegt innerhalb eines 15%igen Abweichungsintervalls. Auffällig sind die durchgängig ca. 30% zu niedrigen Wiederfindungsraten der mit mittlerer therapeutischer Konzentration dotierten Proben der Matrix CDB(N₂). Begründet wird dies mit einem systematischen Fehler bei der Dotierung. Ohne Berücksichtigung dieser Werte wird aus den erhaltenen Ergebnissen aufgrund der tendenziell geringeren Varianz ein leichter Vorteil bei der Matrix CDB(N₂) vermutet.

Die Wiederfindung aus DBS im Vergleich zu einer Standardlösung, die nach der DBS-Methode behandelt wurde, zeigt stark schwankende Werte zwischen 23,7 und 103,4%. Zum Teil konnten Signale nicht ausgewertet werden. Wird die Wiederfindung der DBS dagegen auf eine ClinCal[®]-Probe bezogen, die mit der gleichen Methode behandelt wurde, so resultieren ebenfalls sehr schwankende Werte zwischen 17,2-162,2%. Auffällig bei der Betrachtung der DBS-Ergebnisse sind die hohen Standardabweichungen in den niedrigen therapeutischen Konzentrationen. Sie können dadurch erklärt werden, dass sie außerhalb des Quantifizierungslimits liegen (siehe Kapitel 3.7.3). Auch für diese Anwendung zeigte sich, dass sich die lyophilisierte Matrix nicht eignet.

Es gilt festzuhalten, dass eine Analyse von Immunsuppressiva aus den Matrices CDB und CDB(N₂) mit der aus Vollblut vergleichbar sind. Alle bestimmten Validierungsparameter wie Präzision (Wiederholpräzision), Richtigkeit und Wiederfindung lagen in dem angestrebten Abweichungsintervall von 15- bzw. 20%. Die Werte zeigten eine gute Linearität über den gesamten Kalibrationsbereich. Die Bestimmungs- und Quantifizierungsgrenzen liegen im unteren therapeutischen Bereich. Mit diesen Daten ist eine Validierung der Methode aus CDB (beispielsweise nach Arlenda) möglich.

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist zu folgern, dass sich eine Analyse von Immunsuppressiva aus DBS nicht eignet. Sowohl die Quantifizierungsgrenze als auch die Bestimmungsgrenze liegen im mittleren therapeutischen Bereich. Eine Analyse der Immunsuppressiva im unteren therapeutischen Bereich mit Hilfe der DBS-Methode ist nicht möglich. Als wesentlicher Nachteil dieser Methode ist die starke Verdünnung der Probe durch die Extraktion herauszustellen. In Folge dessen werden letztendlich weniger als ein Zehntel der ursprünglichen Blutprobe (30 µL) massenspektrometrisch analysiert. Nicht untersucht wurde, ob nicht schon das mehrstündige Trocknen der Blutflecke auf den Filterkarten bei Raumtemperatur zur Degradation der instabilen Substanzen führen.

3.8 Analyse von Patientenproben

Für einen Methodenvergleich der in Kapitel 3.7 beschriebenen Probenaufbereitungsmethoden für die Analyse von Immunsuppressiva aus Vollblut wurden Patientenproben aus dem Institut für Klinische Chemie, München, untersucht. Die Patientenproben wurden routinemäßig mittels Präzipitation und nachfolgender on-line SPE-LC-MS/MS analysiert und dienten als Referenzwert. Nachdem dieselben Patientenproben eine Woche bei 4°C lagerten, wurden sie für weitere Analysen freigegeben. Aus diesen Proben erfolgte die Aufbereitung und Lagerung der Vollblut-, CDB-, CDB(N₂)- und DBS-Proben (siehe Kapitel 3.7). Die erhaltenen Überstände bzw. Extrakte wurden am Institut für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung, Nürnberg-Heroldsberg, an dem Tandem-Massenspektrometer API 5000 der Firma AB SCIEX vermessen.

Zunächst wurde ein interlaboreller Vergleich mit den präzipitierten Vollblutproben durchgeführt. Wie aus Abbildung 78 hervorgeht, zeigen die berechneten Passing-Bablok Geraden eine gute Übereinstimmung.

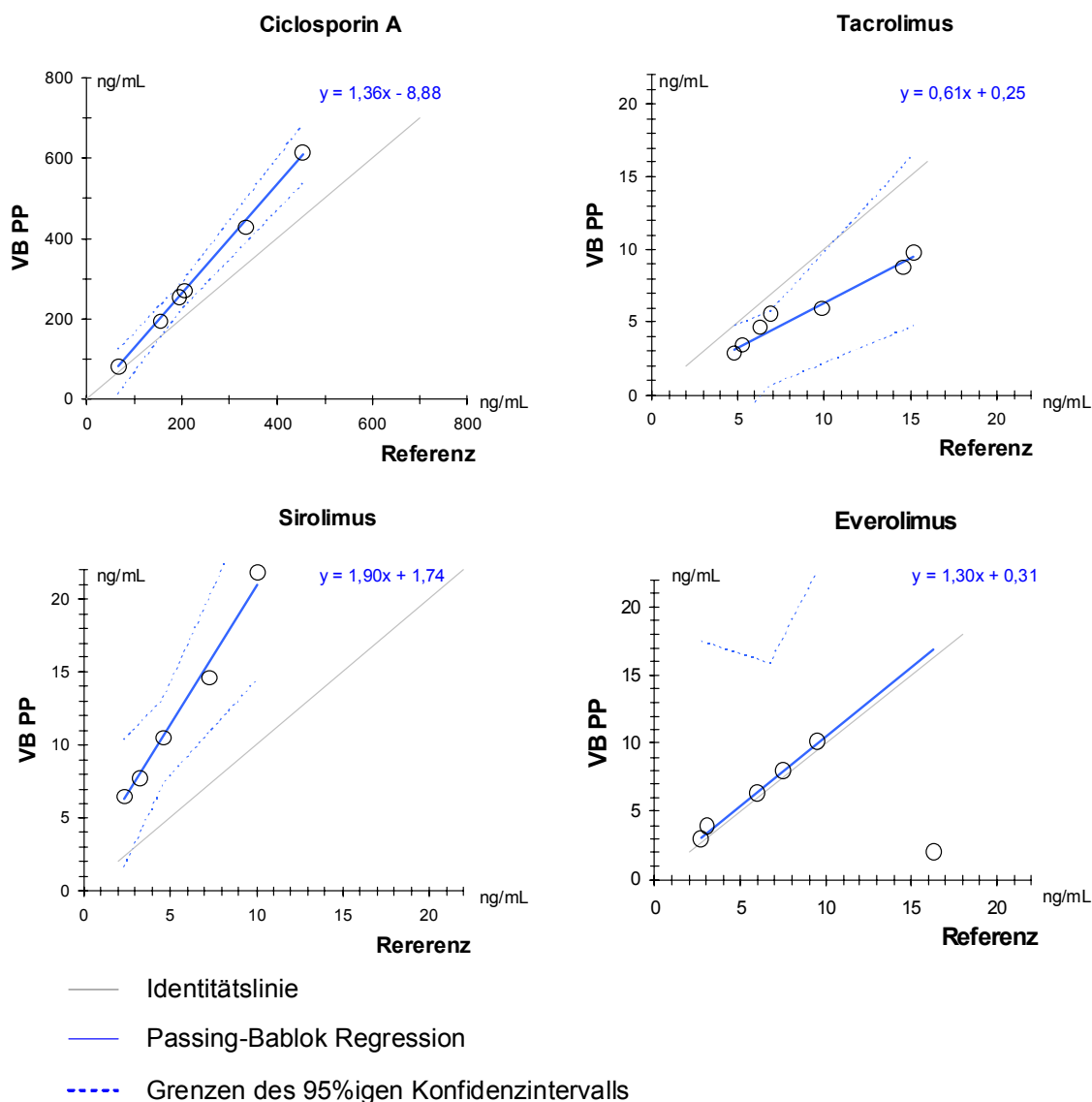


Abbildung 78: Interlaboreller Vergleich (Passing-Bablok Plot). Antikoagulierte Vollblutproben von Patienten wurden präzipitiert (siehe Kapitel 3.7) und die Immunsuppressiva mit zwei verschiedenen Tandem-Massenspektrometern quantifiziert.

Die Empfindlichkeit des AB Sciex MS-Gerätes scheint für Tacrolimus etwas geringer und für Sirolimus etwas höher zu sein. Die Abweichung kann auch auf einem systematischen Fehler beruhen. Beide Analysenprotokolle unterscheiden sich in den chromatographischen Bedingungen. Die Routinemethode weist noch einen zusätzlichen SPE-Schritt auf. Daher kann ein Einfluss von Matrixeffekten nicht ausgeschlossen werden. Die Kalibration erfolgte mit kommerziellen Kalibratoren (siehe Kapitel 3.7).

Beim intralaborellen Vergleich der präzipitierten Vollblutproben mit den CDB-Proben fällt auf, dass die durch Kälte-Schock hergestellten CDB-Proben besser übereinstimmen, als die durch Hitze-Schock hergestellten CDB-Proben (siehe Abbildung 79 und Abbildung 80).

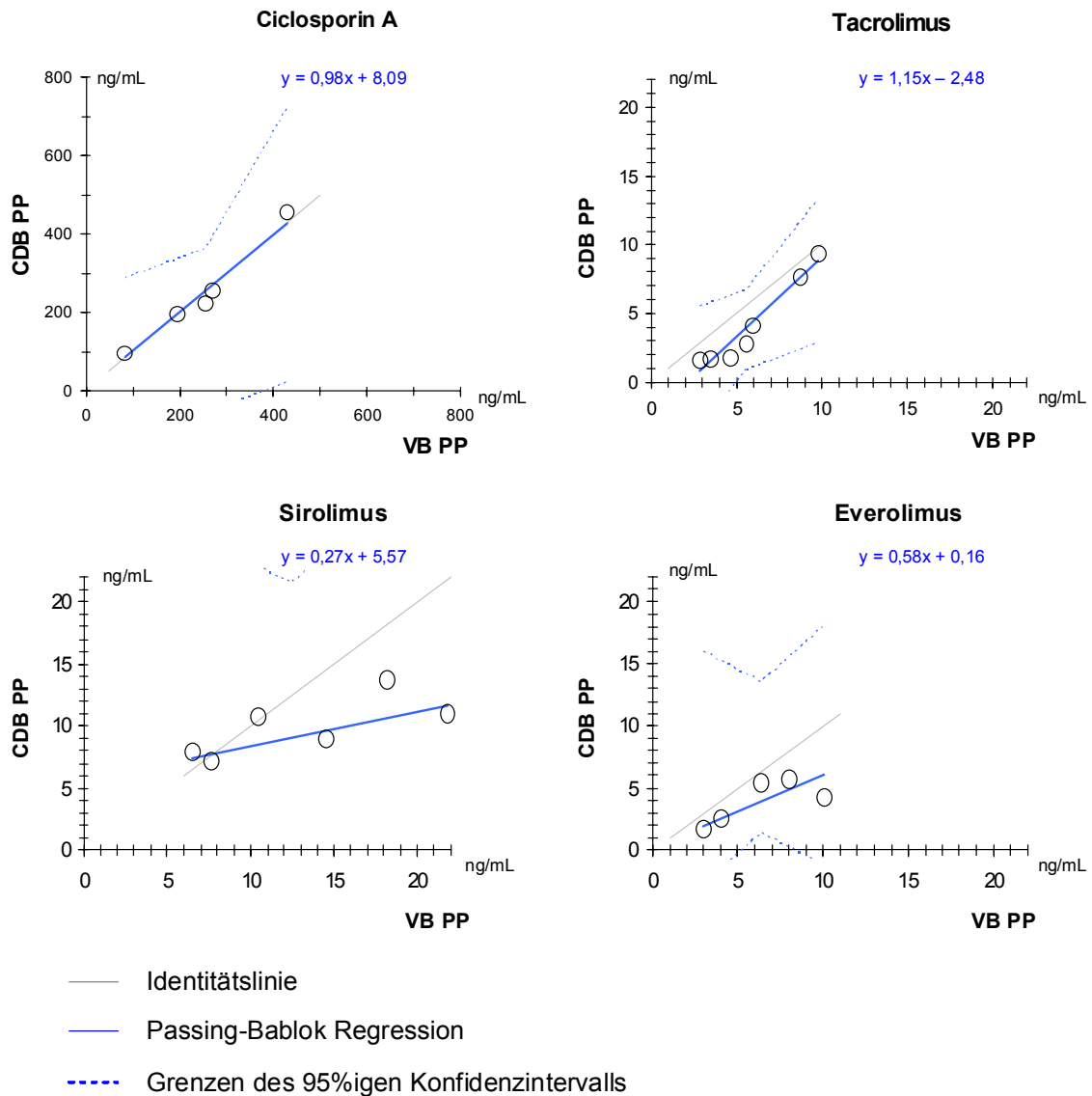


Abbildung 79: Intralaboreller Vergleich (Passing-Bablok Plot). MS/MS-Bestimmung der Immunsuppressiva in präzipitiertem Vollblut (VB PP) und in CDB-Proben von Patienten.

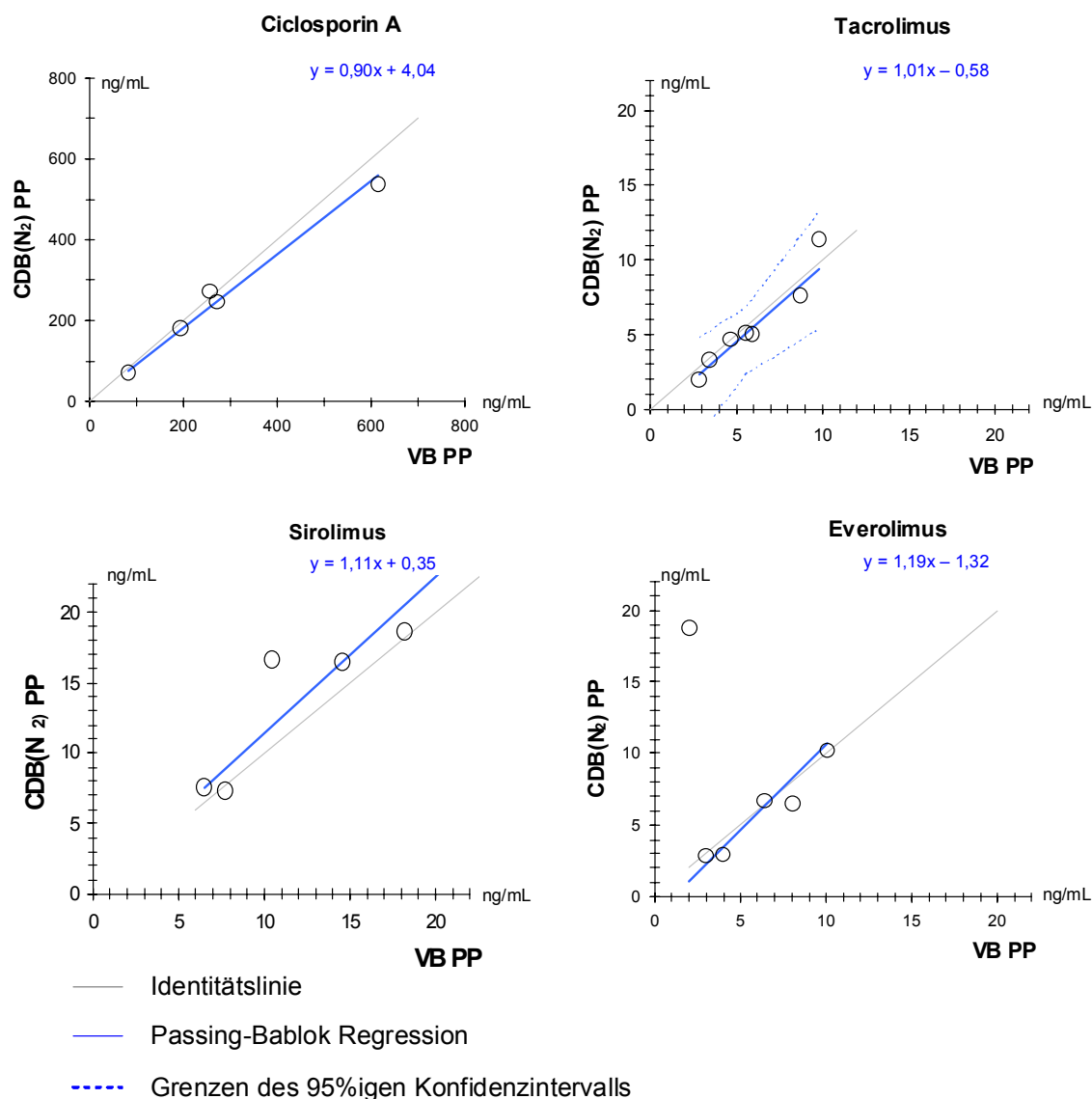


Abbildung 80: Intralaboreller Vergleich (Passing Bablok Plot). MS/MS-Bestimmung der Immunsuppressiva in präzipitiertem Vollblut und in CDB(N₂)-Proben von Patienten.

Der Grund hierfür liegt in der komplexen, teilweise manuell durchgeführten Herstellung der Hitze-Schock behandelten Proben. Bei vollständiger Automation der thermischen Behandlung werden ähnliche übereinstimmende Werte mit den präzipitierten Vollblutproben erwartet.

Der Vergleich von präzipitiertem Vollblut und getrockneten Blutflecken zeigt, dass die Bestimmung von Cyclosporin A relativ gut übereinstimmt. Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus werden jedoch in den DBS-Proben der untersuchten Patientenproben falsch

negativ bestimmt (siehe Abbildung 81). Die Kalibration erfolgte mit selbst dotierten Vollblutproben (siehe Kapitel 3.7).

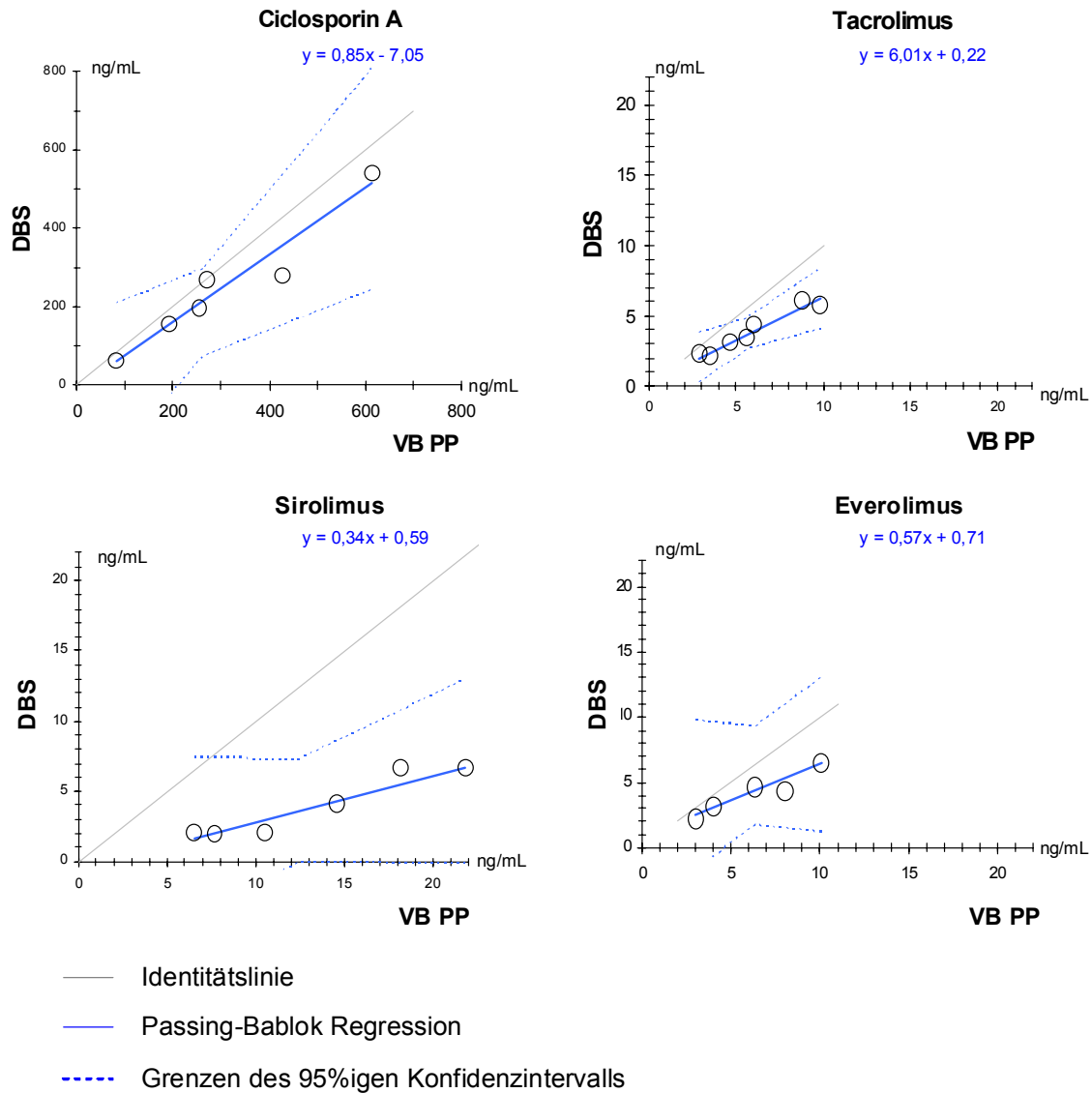


Abbildung 81: Intralaboreller Vergleich (Passing Bablok Plot). MS/MS-Bestimmung der Immunsuppressiva in präzipitiertem Vollblut und in getrockneten Blutflecken (DBS) von Patienten.

Mehrere Einflussfaktoren erschweren eine schlüssige Interpretation der vergleichenden Untersuchungen an Patientenproben. Zum einen waren die Patientenproben bereits über eine Woche gealtert, bevor sie aufgearbeitet wurden. Zusätzlich wurden die aufbereiteten Patientenproben unterschiedlich lange bei -20°C gelagert.

4 Zusammenfassung

Die Dissertationsschrift beschreibt die Entwicklung, Evaluierung und Teilvalidierung einer multidimensionalen on-line SPE-POPLC-MS/MS Plattform für die hochselektive Aufkonzentrierung und vollautomatische Analyse der erythrozytär gebundenen Immunsuppressiva Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus nach in-line Prozessierung von antikoaguliertem Vollblut. Das Analysensystem ermöglicht eine direkte Injektion von Vollblut und dessen in-line Prozessierung sowie eine effiziente Abreicherung von Matrixsubstanzen über Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) vor der analytischen HPLC-Trennung. Substanzen, die die massenspektrometrische Detektion stören, wie z.B. Phospholipide konnten nachweislich zu über 90% eliminiert werden. Die anschließende on-line HPLC-Trennung mit Hilfe der POPLC (Phasen-optimierte Flüssigkeitschromatographie) zeigt bei der Detektion mit einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) keine Ionensuppression und gewährt daher eine störungsfreie Analyse.

Für eine vollautomatische Analyse zellulär gebundener Wirkstoffe in Vollblut waren folgende 3 essentielle Schritte zu realisieren und zu optimieren sowie in eine Analysenplattform zu integrieren:

1. die Überführung von Vollblut in eine homogene Matrix,
2. eine selektive on-line Abreicherung der Probenmatrix mit gleichzeitiger Aufkonzentrierung der Zielanalyte und
3. eine chromatographische Trennung der Analyte sowie eine Abtrennung restlicher interferierender Matrixbestandteile.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden daher folgende Schwerpunkte bearbeitet:

- die Optimierung der in-line Hitzeschock-Behandlung von Vollblut und dessen Überführung in CDB (Zell-desintegriertes Blut) für eine routinemäßige Anwendung,

- die Entwicklung eines effizienten Reinigungsverfahrens für das Analysensystem zum Zweck einer erhöhten Robustheit und routinemäßigen Anwendung,
- der Umbau des zur Verfügung stehenden Analysengerätes für die Anwendung eines multidimensionalen on-line SPE-Verfahrens zur Abreicherung der CDB-Matrix,
- die Optimierung der Trennung aller Analyte sowie verbleibender Matrixbestandteile für eine ungestörte massenspektrometrische Bestimmung,
- die partielle Validierung der Methode als Nachweis für deren Routinetauglichkeit und abschließend
- einer Kreuzvalidierung um die Leistungsstärke der in dieser Arbeit entwickelten Probenaufbereitung im Vergleich zu anderen gängigen Probenaufbereitungsverfahren aufzuzeigen.

Bei der Transformation einer antikoagulierten Vollblutprobe mittels Hitzeschock-Behandlung in die neue biologische Matrix Zell-desintegriertes Blut (Cell-disintegrated blood, CDB) werden die Blutzellen vollständig desintegriert und liegen hauptsächlich als Mikrovesikel vor [7]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Verfahrensschritt optimiert.

In diesem Zusammenhang galt es zunächst eine hypotone Lyse der Erythrozyten durch die Vermischung mit der mobilen Phase in den HPLC-Kapillaren zu unterbinden, da die Hämolyse der Erythrozyten zur unerwünschten Bildung von sogenannten „Ghosts“ führt. Eine Hämolyse der Vollblutprobe konnte dadurch verhindert werden, dass die Probe im Verlauf der Injektion über Luftsegmente von der mobilen Phase abgetrennt wurde. Herausgearbeitet wurde das optimale Verhältnis des Volumens der Probe und der Volumina der beiden Luftsegmente bei einer gegebenen Flussrate.

Ein weiterer Optimierungsschritt betraf die Robustheit der Analysenplattform. Die mehrfache (>>100) Injektion von viskösen Vollblutproben und deren Hitzeschock-Behandlung in einer Edelstahlkapillare (300 x 0,5mm ID) bei 75°C führt zu Ablagerung von Proteinen und Lipiden auf der Innenoberfläche der Kapillaren. Dieser „Biofilm“ kann zum Verschluss der Kapillaren und zu einem sogenannten „Carry-over“ oder „Memory“-Effekt führen. Entsprechende

Versuche ergaben, dass Edelstahlkapillaren sehr schnell einen entsprechenden „Biofilm“ aufbauen. Kapillaren aus PEEK hingegen besitzen eine bessere Biokompatibilität, d.h. Matrixbestandteile lagern sich weniger ab. Um insbesondere die beheizte Edelstahlkapillare, d.h. den Reaktor von Matrixresten zu säubern, wurden verschiedene Reagenzien getestet. Mit Bicinchoninsäure (BCA) wurde ein optimales Reagenz gefunden. Eine 30-minütige Spülung der auf 60°C erwärmten Edelstahlkapillare mit BCA nach ca. 200 Injektionen erlaubt einen störungsfreien Betrieb der Analysenplattform. Von Vorteil ist weiterhin, dass der Reinigungsprozess – wie in dieser Arbeit erstmalig gezeigt - mit Hilfe eines UV/VIS Detektors direkt verfolgt und dokumentiert werden kann.

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war eine effiziente Abreicherung der Vollblut- bzw. CDB-Matrix und eine selektive Anreicherung der Immunsuppressiva, als Modellanalyte für erythrozytär gebundene Wirkstoffe. Bei der Aufreinigung der komplexen CDB-Matrix sollte eine Qualität erreicht werden, die es ermöglicht unter Routinebedingungen eine durch Matrixeffekte weitgehend ungestörte Detektion der Zielanalyte mit Hilfe eines Tandem-Massenspektrometers durchzuführen. Die chromatographischen Verfahrensschritte sollten in die Analysenplattform integriert und somit automatisiert werden. Für die Aufreinigung wurde die Festphasenextraktion (SPE) mittels Kartuschen (10x2mm bzw. 10x1mm ID) verwendet. Die Voraussetzungen für die Automatisierung der SPE-Schritte konnten durch den Umbau eines Symbiosis™ Pharma Systems erreicht werden. Durch Einbau eines zusätzlichen 6-Wege Schaltventils mit integriertem T-Stück können zwei SPE-Kartuschen in Reihe geschaltet werden. Dadurch besteht die Möglichkeit der Aufkonzentrierung der Analyte auf jeder der beiden SPE-Kartuschen. Dies geschieht, indem die zum Transfer der Analyte von einer auf die andere Kartusche verwendete mobile Phase mit einem weiteren Lösemittel verdünnt wird. Dieses zusätzliche Lösemittel wird dem Eluat der ersten SPE-Kartusche über ein T-Stück zugeführt, sodass die zweite SPE-Kartusche mit einem Gemisch dieser beiden Lösemittel durchströmt wird.

Um die Anzahl der chromatographischen Aufreinigungsschritte zu erhöhen wurde das Symbiosis™ Pharma System zusätzlich dahingehend verändert, dass ein Austausch der zweiten SPE-Kartusche mit einer dritten erfolgen kann. Das zweite 6-Wege Schaltventil mit integriertem T-Stück vor der analytischen Trennsäule ermöglicht eine optionale in-line Verdünnung der mobilen Phase und dadurch eine abschließende Aufkonzentrierung der

Analyte auf dem Kopf der Trennsäule. Um die angestrebte Effizienz und Selektivität bezüglich der Aufbereitung der komplexen CDB-Matrix zu erreichen wurden 2 bzw. 3 SPE-Kartuschen verwendet, die mit unterschiedlichen stationären Phasen gepackt waren. Die chromatographischen Trennprinzipien dieser Packungsmaterialien sind voneinander unabhängig. Sie erfüllen damit das Kriterium der Orthogonalität, welches eine Grundvoraussetzung für ein multidimensionales Trennverfahren ist. Da die niedermolekularen Analyte allen Trennprinzipien unterliegen, erfüllt das in dieser Dissertation ausgearbeiteten Analysenverfahren für diese Fraktion auch das zweite Kriterium für eine Multidimensionalität, die Vollständigkeit („comprehensiveness“).

Im ersten Aufreinigungsschritt erfolgt die Abtrennung makromolekularer Komponenten der CDB-Matrix. Dies sind vorwiegend Plasmaproteine und Hämoglobin sowie Kohlenhydrate und Nukleinsäuren. Die Fraktionierung wird über ein sogenanntes „Restricted Access Material“ (RAM) erreicht. LiChrospher® ADS ermöglicht die simultane Anwendung von zwei chromatographischen Trennprinzipien, Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) und Umkehrphasenchromatographie (Reversed-Phase Chromatography, RPC). Die molekulare Ausschlussgrenze liegt bei ca. 15kDa. Für die ausschließlich im Poreninneren stattfindende RPC, d.h. die Retention und Extraktion der sehr hydrophoben Immunsuppressiva wurde eine C-4 Modifikation gewählt.

Im zweiten Aufreinigungsschritt erfolgt die Fraktionierung der niedermolekularen Komponenten in Zielanalyte und Phospholipide. Phospholipide stören massiv die massenspektrometrische Detektion im positiven Elektrospray-Ionisations Modus. Diese Ionensuppression oder auch „Matrixeffekt“ konnte bislang nicht zufriedenstellend eliminiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es ein poröses Trägermaterial (ProntoSil PLR) zu finden, welches selektiv hydrophobe Phospholipide aufgrund einer molekularen Formerkennung („Slot“-Mechanismus) bindet. Es konnte gezeigt werden, dass hierdurch über 90% der Phospholipidfraktion abgereichert wird. Die Analytfraktion konnte von der stärker retenierten Phospholipidfraktion über eine sogenannte „front-cut“-Schaltung abgetrennt und nach einer in-line Verdünnung der entsprechenden mobilen Phase auf die nachgeschaltete 3. SPE-Kartusche transferiert werden. Die extrahierten Phospholipide können von der 2. SPE-Kartusche mit reinem Methanol eluiert werden. Somit kann die Kartusche wiederverwendet werden.

Im letzten Fraktionierungsschritt erfolgt die Abreicherung noch nicht abgetrennter hydrophiler, neutraler bzw. anionischer, niedermolekularer Matrixbestandteile. Dies wird über eine stationäre Phase mit kombiniertem Retentionsmechanismus erreicht. Das Oasis[®] MCX-Material vereint einen hydrophil-lipophil-balancierten Retentionsmechanismus mit einem Kationenaustauscher (Ion Exchange Chromatography, IEX). Dabei bestimmt der pH-Wert des zur Fraktionierung verwendeten Puffers den vorwiegend genutzten Retentionsmechanismus. Um die Zielanalyte über den Kationenaustauschmechanismus zurückzuhalten, muss der Puffer sauer eingestellt werden. Die dabei nicht retenierte Restmatrix wird in den Abfall gespült. Nach diesem dritten Aufreinigungsschritt erfolgt der Transfer der Zielanalyte über eine weitere in-line Verdünnung auf die analytische Säule.

Für die analytische Trennung der Immunsuppressiva wurde ein seit kurzem kommerziell erhältliches Verfahrensprinzip, die sogenannte Phasen-optimierte Flüssigkeitschromatographie (POPLC) erstmalig eingesetzt. Die Anwendung der POPLC erlaubt es, die Immunsuppressiva in kurzer Zeit unter isokratischen Bedingungen mit einer vorgegebenen mobilen Phase zu trennen. Der Vorteil der POPLC liegt in einer verkürzten Analysenzeit, da der Reäquilibrationsschritt einer Gradientenelution entfällt. Die verwendete mobile Phase wurde so gewählt, dass sie zu einer hohen Ionisationsausbeute im Massenspektrometer und damit zu einer erhöhten Nachweisstärke führt. Weiterhin gelang es mit Hilfe der POPLC isobare d.h. im MS nicht unterscheidbare Substanzen gezielt zu trennen. Darüber hinaus konnte das Elutionsfenster der Immunsuppressiva zeitlich so gewählt werden, dass keine Störungen, d.h. Matrixeffekte durch früh und spät eluierende Probenkomponenten auftreten. Dies konnte durch sogenannte Nachsäuleninfusionsexperimente eindeutig bewiesen werden. Anhand dieses Nachweisverfahrens für Matrixeffekte konnte auch gezeigt werden, dass die Aufreinigung der CDB-Matrix über das beschriebene multidimensionale SPE-Verfahren zu einem – im Vergleich zu einem eindimensionalen, d.h. konventionellen SPE-Verfahren - wesentlich „saubereren“ Extrakt und somit zu einer störungsfreien MS-Detektion führt.

Ein weiterer Schwerpunkt der Dissertation war die Validierung des ausgearbeiteten Analysenverfahrens. Die Validierung konnte nur eingeschränkt erfolgen, da der zur Verfügung stehende Probengeber keine Durchmischung einer sedimentierten antikoagulierten

Vollblutprobe und keine Zugabe eines Internen Standards erlaubte. Daher erfolgten diese Schritte manuell. Die ermittelten Werte für die Präzision, Richtigkeit und Linearität des on-line MD-SPE-POPLC-MS/MS Verfahrens mit in-line Prozessierung von antikoaguliertem Vollblut liegen für alle untersuchten Immunsuppressiva innerhalb der von der Federal Drug Administration (FDA) geforderten Grenzen für eine bioanalytische Bestimmungsmethode. Die Wiederfindung der Analyte wurde für jeden einzelnen SPE-Aufreinigungsschritt bestimmt und ergab in der Summe eine nahezu vollständige Extraktion aller untersuchten Immunsuppressiva aus den Erythrozyten bzw. aus der CDB-Matrix.

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit einer Kreuzvalidierung abgeschlossen. Dieses Verfahren erlaubt es, unterschiedliche Methoden zur Aufreinigung von biologischen Flüssigkeiten hinsichtlich Präzision, Richtigkeit und Linearität miteinander zu vergleichen. Voraussetzung hierfür ist, dass die Trennung und Detektion der Zielanalyte für alle untersuchten Methoden identisch ist. Zu diesem Zweck wurden jeweils identische Vollblutproben von immunsupprimierten Patienten (nach Ablauf der Probenlagerung) aliquotiert und wie folgt aufbereitet:

1. Hitzeschock-Behandlung; CDB
2. Kälteschock-Behandlung; CDB(N₂)
3. Präzipitation und Zentrifugation; VB PP
4. Applikation /Elution auf /von Filterpapier (Dried Blood Spot; DBS)

Für die CDB(N₂)-Proben ergaben sich im Vergleich zu den CDB-Proben eine höhere Richtigkeit und eine verbesserte Präzision. Für die Matrices CDB und CDB(N₂) konnte eine nahezu 100%ige Wiederfindung nachgewiesen werden. Diese ist mit der Wiederfindung aus präzipitiertem Vollblut (VB PP) vergleichbar. Untersuchungen zur Wiederholpräzision ergaben für alle untersuchten Zielanalyte aus der Matrix CDB über deren gesamten therapeutischen Bereich ein Abweichungsintervall von <10% an vier aufeinanderfolgenden Tagen. Die Bestimmungsgrenze von 1ng/mL (Lower Limit of Detection, LLOQ) konnte für die Analyte Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus nur für die CDB(N₂)-Matrix erreicht werden.

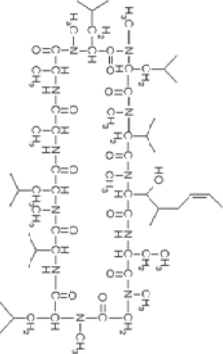
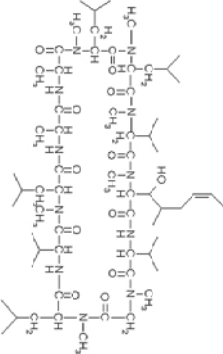
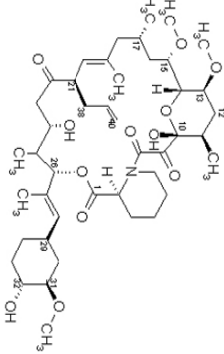
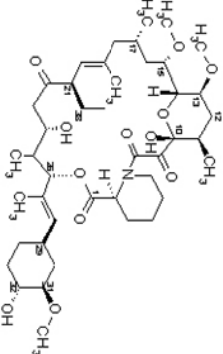
Bei der Bestimmung der Immunsuppressiva in getrockneten Blutflecken (DBS) lag die Richtigkeit für zahlreiche DBS-Proben außerhalb der geforderten Grenzen. Im Vergleich zu den anderen Probenaufbereitungsmethoden waren nur wenige Kalibrationspunkte in die Kalibrationsgerade einzubeziehen. Bei der DBS-Methode liegt die Quantifizierungsgrenze für alle untersuchten Analyte nur im mittleren therapeutischen Bereich. Daher eignet sich dieses Verfahren nicht für die Therapeutische Arzneimittelkontrolle (TDM) bei immunsupprimierten Patienten.

5 Anhang

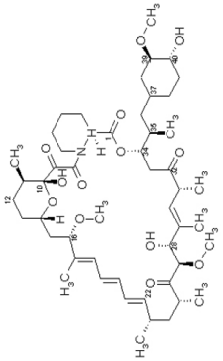
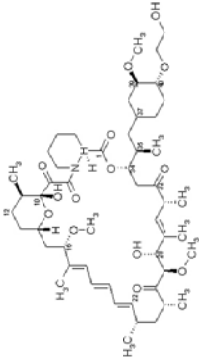
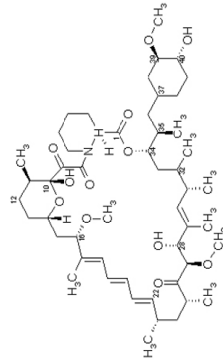
5.1 Tabellarische Zusatzinformationen

| | |
|---|-----|
| ANHANG 1: EIGENSCHAFTEN VON CYCLOSPORIN A UND TACROLIMUS UND IHREN INTERNEN STANDARDS. | 1 |
| ANHANG 2: EIGENSCHAFTEN VON SIROLIMUS UND EVEROLIMUS UND IHREM INTERNEN STANDARD..... | 1 |
| ANHANG 3: DOSIERSHEMA DER IMMUNSUPPRESSIVA. | 1 |
| ANHANG 4: BEDEUTENDE INTERAKTIONEN ALLER UNTERSUCHTEN IMMUNSUPPRESSIVA. | 1 |
| ANHANG 5: BEDEUTENDE INTERAKTIONEN EINZELNER IMMUNSUPPRESSIVA. | 1 |
| ANHANG 6: PHARMAKOKINETISCHE DATEN DER IMMUNSUPPRESSIVA: LIBERATION UND RESORPTION..... | 1 |
| ANHANG 7: PHARMAKOKINETISCHE DATEN DER IMMUNSUPPRESSIVA: VERTEILUNG. | 1 |
| ANHANG 8: PHARMAKOKINETISCHE DATEN DER IMMUNSUPPRESSIVA: METABOLISIERUNG UND ELIMINATION. | 1 |
| ANHANG 9: UNTERTEILUNG EINES ANALYSENZYKLUS DER IMMUNSUPPRESSIVA MIT DER ON-LINE MD-SPE- POPLC-MS/MS METHODE (TRIPLE-KARTUSCHEN MODUS) IN TEILSCHRITTE. | 1 |
| ANHANG 10: ZUSAMMENSTELLUNG KONVENTIONELL GENUTZTER ON-LINE SPE-LC-MS/MS SYSTEME, AUF DIE IN DER VORLIEGENDEN ARBEIT BEZUG GENOMMEN WIRD. | 255 |
| ANHANG 11: ZUSAMMENSTELLUNG ENTWICKELTER ON-LINE (MD)-SPE-POPLC METHODEN..... | 1 |

Anhang 1 : Eigenschaften von Ciclosporin A und Tacrolimus und ihren Internen Standards.

| Strukturformel | Handelsname | Ursprung | Molekulargewicht [Da] | Details |
|---|--|---------------------------------------|-----------------------|---|
|  | Ciclosporin® Hexal Ciclosporin-1A- Pharma® Immunospon® Sandimmun® Neoral® | <i>Poly podactium inflammatum</i> | 1202,63 | <ul style="list-style-type: none">• Einführung in 1983, seitdem das Immunsuppressivum nach Nieren-, Leber-, Lungen- und Herztransplantationen• hydrophobes zyklisches Polypeptid aus 11 Aminosäuren• enthält eine einzigartige Aminosäure N-methyl-(4R)-4-butanyl-4-methyltreonin• enthält zwei ungewöhnliche Aminosäuren Sarcosin und D-Alanin• 7 Aminosäuren sind N-methyliert, die restlichen vier freien Stickstoffatome bilden [316]• Wasserstoffbrückenbindungen zu Carbonylfunktionen aus [317]• Neoral® besitzt wesentlich verbesserte, schnellere und kontrollierbare Dosierung durch die Einführung einer neuen Darreichungsform mit verbesserter Galenik.• Neoral® ist eine thermodynamisch stabile Mikroemulsion |
|  | Ciclosporin D : Interner Standard für Ciclosporin A | | | |
|  | Tacrolimus FK 506 Prograf® Protopic® | <i>Streptomyces tsukubensis</i> | 822,05 | <ul style="list-style-type: none">• hydrophobes Makrolid-Lacton• als Hartgelatinekapsel auf den Markt |
|  | Ascomycin : Interner Standard für Tacrolimus | | | |

Anhang 2: Eigenschaften von Sirolimus und Everolimus und ihrem Internen Standard.

| | Strukturformel | Handelsname | Ursprung | Molekulargewicht [Da] | Details |
|---|--|------------------------|-----------------------------------|-----------------------|---|
| Sirolimus |  | Sirolimus Rapamune® | <i>Streptomyces hygroscopicus</i> | 914,2 | <ul style="list-style-type: none">• alter Name : Rapamycin• Makrolidantibiotikum mit einer Makrolidlacton-Struktur• strukturelle Ähnlichkeiten mit Tacrolimus• als Nanopartikelabletten im Handel |
| Everolimus |  | Certican® | synthetisch | 958,25 | <ul style="list-style-type: none">• synthetisches Derivat von Sirolimus• Makrolidantibiotikum• Makrolidlacton-Struktur• Grund seiner Entwicklung war die geringere Halbwertszeit mit 20-40 Stunden gegenüber Sirolimus |
| Desmethoxysirolimus : Interner Standard für Sirolimus und Everolimus |  | | | | |

Anhang 3: Dosierschema der Immunsuppressiva.

| | Initialdosis [mg / kg / Tag] | Erhaltungsdosis [mg / kg / Tag] | Vollblutspiegel [ng / mL] | Talspiegel [ng / mL] (C ₀ -Monitoring) | Talspiegel [ng / mL] (C ₂ -Monitoring) |
|---------------|--|---------------------------------|---------------------------|--|---|
| Ciclosporin A | Sandimmun : 10 - 14 Sandimmun Optoral : 6 - 10 | 2 - 6 in 2 Einzeldosen | 100 - 400 | während Initialphase : 135 - 353 während Erhaltungsphase : 22 - 216 | 600 - 1200 |
| Tacrolimus | Oral : 0,1 - 0,3 in 2 Einzeldosen Intravenös : 0,01 - 0,1 | 0,1 - 0,3 in 2 Einzeldosen | 3 - 15 | während Initialphase : 10 - 20 während Erhaltungsphase : 5 - 10 | nicht empfohlen |
| Sirolimus | 6 | 2 | 4 - 12 | mit Ciclosporin Begleittherapie : 4 - 12 Monotherapie : 12 - 20 | nicht empfohlen |
| Everolimus | 0,75 - 1,5 in 2 Einzeldosen | noch nicht etabliert | 3 - 8 | mit Ciclosporin Begleittherapie : 3 - 8 | in Studien : 350 - 1400 |

Anhang 4: Bedeutende Interaktionen aller untersuchten Immunsuppressiva.

| Immunsuppressivum | anderes Arzneimittel | Interaktion |
|--|--|--|
| Ciclosporin A Tacrolimus Sirolimus Everolimus | Inhibitoren des Enzyms CYP 3A4: | Erhöhung der Ciclosporinkonzentration |
| | • Azol-Antimykotika | |
| | • Makrolidantibiotika [318] | |
| | • hoch dosierte Corticosteroide | |
| Ciclosporin A Tacrolimus Sirolimus Everolimus | • einige Calcium-Kanal-Antagonisten | Erhöhung der Ciclosporinkonzentration |
| | • H ₂ -Antihistamin-Rezeptor-Antagonisten | |
| | • orale Antikoagulantien | |
| | • Sexualhormone | |
| | • Grapefruit-Saft [184] | |
| Ciclosporin A Tacrolimus Sirolimus Everolimus | Induktoren des Enzyms CYP 3A4: | Erniedrigung der Ciclosporinkonzentration |
| | • Antikonvulsiva | |
| | • Antituberkuläre Antibiotika | |
| | • Johanniskrautextrakt [167] | |
| Ciclosporin A Tacrolimus Sirolimus Everolimus | Corticosteroiden | Corticosteroide zeigen sowohl induktive als auch inhibitorische Effekte auf das Enzym CYP 3A4. Ebenso zeigen sie induktive Effekte auf das P-Glykoprotein [316]. |
| | | |
| | | |
| | | |

Anhang 5: Bedeutende Interaktionen einzelner Immunsuppressiva.

| Immunsuppressivum | anderes Arzneimittel | Interaktion |
|--------------------------|--|--|
| Ciclosporin A | Tacrolimus | Tacrolimus beeinflusst die Pharmakokinetik von Ciclosporin durch eine kompetitive Interaktion mit CYP 3A4 [316]. Daraus resultieren beispielsweise eine verlängerte Halbwertszeit und ein additiv nephrotoxischer Effekt |
| Ciclosporin A | Mycophenolatmofetil | Ciclosporin vermag die Wirkung von Mycophenolatmofetil zu unterdrücken [184] |
| Ciclosporin A | Minoxidil | Additiver Effekt der Hypertrichose wurde berichtet |
| Ciclosporin A | Phenytoin | Schwerwiegende gingivale Hyperplasie wurde nach kombinierter Gabe berichtet [319] |
| Ciclosporin A | kaliumparende Diuretika | Eventuell auftretende Hyperkalämie |
| Ciclosporin A | Metoclopramid | Erhöhte Bioverfügbarkeit von Ciclosporin A möglich |
| Ciclosporin A | Aniocardon | Verdopplung der Ciclosporinkonzentration im Blut möglich [320] |
| Ciclosporin A | Statine | Abbau von Statinen wird gehemmt |
| Ciclosporin A | Digitoxin | Erhöhten Digitoxin-Plasmakonzentrationen möglich |
| Ciclosporin A | orale Kontrazeptiva | Vereinzelte Hepatotoxizität beschrieben |
| Tacrolimus | <ul style="list-style-type: none"> • Gandaclovir • nichtsteroidale Entzündungshemmer • Antibiotika • Chemotherapeutika | Neuro- und Nephrotoxizität wird verstärkt |
| Tacrolimus | <ul style="list-style-type: none"> • Theophyllin | Konzentrationserhöhung von Tacrolimus möglich [319] |
| Tacrolimus | <ul style="list-style-type: none"> • HMG-CoA Reduktase-Hemmer • Statine | lebensbedrohlichen Rhabdomyolyse möglich [186] |
| Sitrolimus Everolimus | <ul style="list-style-type: none"> • Erythromycin • Azithromycin | Reduzierte Everolimus-Clearance |

Anhang 6: Pharmakokinetische Daten der Immunsuppressiva: Liberation und Resorption.

| Liberation | | Resorption | | |
|---------------|--|--|---|--|
| | | Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe [%] | Maximaler Blutspiegel (C_{max}) nach [h (t_{max})] | Einfluss fettreicher Nahrung [%] |
| Ciclosporin A | Oral : Mikroemulsion mit Tensid | auf Öl basierende Formulierung : 1 - 89 Mikroemulsion : 20 - 50 | auf Öl basierende Formulierung : 1 - 8 Mikroemulsion : 2 | k.A. |
| Tacrolimus | Oral : Pulver in Kapseln Intravenös : Wirkstoff in Dispersion | 4 - 89 | 1 - 2 | C_{max} : -15 - 38 AUC : +35 |
| Sirolimus | Oral : Nanopartikel in Tablettenform | 20 - 25 | 1 - 3 | C_{max} : -34 t_{max} : +3,5 - 7 AUC : +35 |
| Everolimus | Oral : gut wasserlösliche Tabletten Nasen-Magensonde | 20 | 1 - 2 | C_{max} : -60 t_{max} : +1,5 AUC : -16 |

Anhang 7: Pharmakokinetische Daten der Immunsuppressiva: Verteilung.

| | | Verteilung | |
|-----------------------|---|--|-----------------------------|
| Zellulär : Plasma [%] | Zellbindung [%] | Plasmaproteinbindung [%] | Verteilungsvolumen [L / kg] |
| Ciclosporin A | 2 : 1 Erythrozyten : 51 - 58 Lymphozyten : 4 - 9 Granulozyten : 5 - 12 Plasmaproteine : 33 - 47 freier Wirkstoff : 1 - 6 | Lipoproteine : 90 (HDL : 43 - 57 LDL : 25 VLDL : 2 andere 8) | 4 - 8 |
| Tacrolimus | 20 : 1 Erythrozyten : 74,6 - 94,9 Leukozyten : 1 Lymphozyten : 1 Plasmaproteine : 2 - 3 | Serumalbumin und α-1-saures Glykoprotein : 99 Lipoprotein deficient Plasma : 38,5 - 68,2 HDL : 21 - 34 LDL : 6 - 14 VLDL : 1 - 4 frei : 0,1 - 0,9 | 50 |
| Sirolimus | 38 : 1 Erythrozyten : 89,9 - 99,1 Lymphozyten : 1 Granulozyten : 1 Plasmaproteine : 3,0 - 3,2 | HDL : 18,7 - 20,3 LDL : 19,3 - 21,7 VLDL : 1,2 frei : 2,5 | 12 |
| Everolimus | k.A. Erythrozyten : 75 | Proteine : 75 | 236 - 450 |

Anhang 8: Pharmakokinetische Daten der Immunsuppressiva: Metabolisierung und Elimination.

| | Metabolisierung | | Elimination | |
|---------------|--|---|---------------------------|---|
| | Metabolisierung [%] | Anzahl Metabolite (identifizierte Hauptmetabolite) | Elimination [%] | Halbwertszeit [h] Clearance [L / h / kg] |
| Ciclosporin A | 99 (Erste Leberpassage : 30) Ort : Leber und Darmwand | 30 (AM1, Am4N , AM9) immunsuppressive Wirkstärke : 10 - 20% | Bilär : 90 Renal : 6 | 6 - 8 0,38 - 3 |
| Tacrolimus | k.A. | 15 (31-O-demethyl-tacrolimus) | Bilär : >90 Renal : 2 | 4 - 60 2,25 - 6,7 |
| Sirolimus | Ort : Leber und Darmwand | 10 | Bilär : >91 Renal : >2 | 62 0,21 |
| Everolimus | k.A. | 20 | Bilär : >80 Renal : 5 | 28 8,8 |

Anhang 9: Unterteilung eines Analysenzyklus der Immunsuppressiva mit der on-line MD-SPE-POPLC-MS/MS Methode (Triple-Kartuschen Modus) in Teilschritte.

| Nummer | |
|--------|--|
| 1 | Größenselektive Fraktionierung des CDBs auf einer LiChrospher® ADS RP4 SPE-Kartusche (RAM), 10x2mm; mobile Phase: Wasser/acetnitril (95/5, v/v); Fluss: 0,25mL/min für 1 Minute und danach 3mL/min für 1 Minute; weitere Abreinigung von Matrixbestandteilen mit mobiler Phase: Wasser/acetnitril (75/25, v/v); Fluss: 3mL/min für 3 Minuten |
| 2 | Transfer der niedermolekularen Fraktion von der RAM- auf eine Prontosil® C30 SPE-Kartusche (Molekulare Formerkennung), 10x2mm; mobile Phase: Methanol; Fluss: 0,45mL/min für 3 Minuten |
| 3 | Aufkonzentrierung der Analyte auf der Prontosil® C30-SPE-Kartusche, 10x2mm durch in-line Verdünnung; mobile Phase: 10mmolare Ammoniumformatlösung mit pH=2,8; Fluss: 2mL/min für 3 Minuten |
| 4 | Formselektive Fraktionierung der niedermolekularen Fraktion auf der Prontosil® C30-SPE-Kartusche, 10x2mm; mobile Phase: resultiert aus Teilschritt 2 und 3: Methanol/10mmolare Ammoniumformatlösung mit pH=2,8 (20/80, v/v); Fluss: 2,45mL/min für 3 Minuten |
| 5 | Selektive Abtrennung und Transfer der Analytfraktion von der (Phospho-)Lipid-Fraktion durch „front-cut“ bei der Elution von der Prontosil® C30 SPE-Kartusche, 10x2mm auf die Oasis® MCX SPE-Kartusche (HLBC und Kationenaustauscher), 10x1mm, mobile Phase: Methanol/2mmol Ammoniumacetatlösung (75/25, v/v); Fluss: 0,5mL/min für 3 Minuten |
| 6 | Aufkonzentrierung der Analyte auf der Oasis® MCX SPE-Kartusche, 10x2mm durch in-line Verdünnung; mobile Phase: 10mmolare Ammoniumformatlösung mit pH=2,8; Fluss: 1,5mL/min für 3 Minuten |
| 7 | Chemoselektive Fraktionierung der niedermolekularen Fraktion auf der Oasis® MCX SPE-Kartusche, 10x2mm; mobile Phase: resultiert aus Teilschritt 5 und 6: Methanol/10mmolare Ammoniumformatlösung mit pH=2,8 (20/80, v/v); Fluss: 2mL/min für 3 Minuten |
| 8 | Transfer der Analyte von der Oasis® MCX SPE-Kartusche, 10x2mm auf die analytische Trennsäule; mobile Phase: Methanol/10mmol Ammoniumacetatlösung (75/25, v/v); Fluss 0,5mL/min für 2 Minuten; (Möglichkeit zur Aufkonzentrierung der Analyte auf der analytischen Säule durch in-line Verdünnung) |
| 9 | Analytische Trennung; mobile Phase: Methanol/2mmolare Ammoniumacetatlösung (75/25, v/v); Fluss 0,5mL/min für 10 Minuten |

Anhang 10: Zusammenstellung konventionell genutzter on-line SPE-LC-MS/MS Systeme, auf die in der vorliegenden Arbeit Bezug genommen

| | konventionelle SPE-LC MS/MS | SPE-LC MS/MS (Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität) |
|---|---|---|
| Probenvorbereitung | | Proteinpräzipitation : MeOH / ZnSO ₄ |
| Injektionsvolumen | 25 µL | 20 µL |
| Fraktionierung auf der 1. Kartusche | SPE-Kartusche : Oasis® HLB (10 x 2 mm) , dp 30 µm Mobile Phase : H ₂ O / ACN (95/5, v/v) Flussrate : 3 mL/min ; 1 min | SPE-Säule : Oasis® HLB (2,1 x 20 mm) , dp 30 µm Mobile Phase : H ₂ O / ACN (95/5, v/v) Flussrate : 5 mL/min ; 1 min |
| Transfer (1. Kartusche ► 2. Kartusche) | | |
| Fraktionierung auf der 2. Kartusche | | |
| Transfer (2. Kartusche ► 3. Kartusche) | | |
| Fraktionierung auf der 3. Kartusche | | |
| Transfer | | |
| Separation | Analytische Säule : LiChrospher® 100 RP 18, 100 x 2 mm ID , dp 8 µm Mobile Phase : MeOH / 2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v) Flussrate : 0,5 mL/min ; 5 min | Analytische Säule : LiChrospher® RP 18, 125 x 4 mm ID , dp 8 µm Mobile Phase : MeOH / 2 mM NH ₄ Ac (90/10, v/v) Flussrate : 0,9 mL/min ; 5 min Split : 1 : 10 |
| Detektion | Quattro Micro , Waters , USA Mode : ESI ⁺ | Quattro Micro , Waters , USA Mode : ESI ⁺ |
| MRM | Ciclosporin D : 1234,0 ► 1217,0 Ciclosporin A : 1120,0 ► 1203,0 Everolimus : 975,5 ► 908,5 Sirolimus : 931,5 ► 864,4 Desmethoxysirolimus : 901,5 ► 834,5 Tacrolimus : 821,4 ► 768,2 Ascomycin : 809,0 ► 756,0 | Ciclosporin D : 1234,0 ► 1217,0 Ciclosporin A : 1120,0 ► 1203,0 Everolimus : 975,5 ► 908,5 Sirolimus : 931,5 ► 864,4 Desmethoxysirolimus : 901,5 ► 834,5 Tacrolimus : 821,4 ► 768,2 Ascomycin : 809,0 ► 756,0 |
| Tuning Parameter | Quelle : Kapillarspannung : 3,73 kV Quellentemperatur : 120 °C Desolvationstemperatur : 350 °C Cone Gasfluss : k. A. Desolvatationsgasfluss : k. A. | Quelle : Kapillarspannung : 3,73 kV Quellentemperatur : 120 °C Desolvationstemperatur : 350 °C Cone Gasfluss : k. A. Desolvatationsgasfluss : k. A. |
| | Analysator : Kollision : k. A. Ionenenergie 1 : 0,5 V LM / HM 1 Auflösung : 14,0 Ionenenergie 2 : 1,0 V LM / HM 2 Auflösung : 14,0 Eingang : 30 Ausgang : 30 | Analysator : Kollision : k. A. Ionenenergie 1 : 0,5 LM / HM 1 Auflösung : 14,0 Ionenenergie 2 : 1,0 LM / HM 2 Auflösung : 14,0 Eingang : 30 Ausgang : 30 |
| Infusionslösung | Standardlösungsgemisch (Konzentration je Analyt : 100ng/mL , gelöst in mobiler Phase | |
| Infusionsflussrate | 10 µL/min | |

Anhang II: Zusammenstellung entwickelter on-line (MD)-SPE-POPLC Methoden.

| | SPE-POPLC MS/MS | 2D-SPE-POPLC MS/MS | MD-SPE-POPLC MS/MS |
|--|---|---|--|
| Probenvorbereitung | 25 µL | 25 µL | 25 µL |
| injektionsvolumen | | | |
| Fraktionierung auf der 1. Kartusche | SPE-Kartusche : Oasis® HLB (10 x2 mm), dp 30 µm Mobile Phase : H ₂ O / ACN (95/5, v/v) Flussrate : 0,27 mL/min ; 1,85 min | SPE-Kartusche : Hysphere C2 (10 x2 mm ID), dp 7 ; Hysphere C8 (10 x2 mm ID), dp 8 ; Hysphere C8 EC-SE (10 x2 mm ID), dp 10 ; Hysphere C18 (10 x2 mm ID), dp 8 ; Lichrospher® ADS RP 4 (10 x2 mm ID), dp 25 ; Oasis® HLB (10 x2 mm), dp 30 µm Flussrate : 0,27 mL/min ; 3 min Mobile Phase : H ₂ O / ACN (95/5, v/v) Flussrate : 3 mL/min ; 1 min Mobile Phase : MeOH Flussrate : 0,45 mL/min ; 3 min In-line Verdünnung : 10 mL NH ₄ formiat, pH = 2,8 Flussrate : 2 mL/min ; 3 min SPE-Kartusche : Oasis® MCK (10 x1 mm ID), dp 25 -35 µm Mobile Phase : MeOH / 10mM NH ₄ formiat, pH = 2,8 (18/82, v/v) Flussrate : 2,45 mL/min ; 3,00 min | SPE-Kartusche : Hysphere C2 (10 x2 mm ID), dp 7 ; Hysphere C8 (10 x2 mm ID), dp 8 ; Hysphere C8 EC-SE (10 x2 mm ID), dp 10 ; Hysphere C18 (10 x2 mm ID), dp 8 ; Lichrospher® ADS RP 4 (10 x2 mm ID), dp 25 ; Oasis® HLB (10 x2 mm), dp 30 µm Flussrate : 0,27 mL/min ; 1 min Mobile Phase : H ₂ O / ACN (75/25, v/v) Flussrate : 3 mL/min ; 1 min Mobile Phase : MeOH Flussrate : 0,45 mL/min ; 3 min In-line Verdünnung : 10 mL NH ₄ formiat, pH = 2,8 Flussrate : 2 mL/min ; 3 min SPE-Kartusche : Promosil C30 (10 x 2mm ID), dp 10 µm Mobile Phase : MeOH / 10mM NH ₄ formiat, pH = 2,8 (18/82, v/v) Flussrate : 2,45 mL/min ; 3 min Mobile Phase : MeOH/10 mM NH ₄ formiat, pH = 2,8 (75/25, v/v) Flussrate : 0,5 mL/min ; 3 min In-line Verdünnung : 10 mL NH ₄ formiat, pH = 2,8 Flussrate : 1,5 mL/min ; 3 min SPE-Kartusche : Oasis® MCK (10 x 1 mm ID), dp 25 - 35 µm Mobile Phase : MeOH / 10 mL NH ₄ formiat, pH = 2,8 (18/82, v/v) Flussrate : 12,0 mL/min ; 3 min |
| Transfer (1. Kartusche ► 2. Kartusche) | | | |
| Fraktionierung auf der 2. Kartusche | | | |
| Transfer (2. Kartusche ► 3. Kartusche) | | | |
| Fraktionierung auf der 3. Kartusche | | | |
| Transfer | Mobile Phase : MeOH / 2 mM NH ₄ Ac (85/15, v/v) Flussrate : 0,25 mL/min ; 6 min In-line Verdünnung : Wasser Flussrate : 0,1 mL/min ; 2 min | Mobile Phase : MeOH / 2mM NH ₄ Ac (78/22, v/v) Flussrate : 0,25 mL/min ; 2 min | Mobile Phase : MeOH / 2mM NH ₄ Ac (75/25, v/v) Flussrate : 0,9 mL/min ; 2 min |
| Separation | Analytische Säule : POPLC -Segmentkombination : C18 (20 mm x3 mm ID) + C30 (20 mm x3 mm ID) + CN (30 mm x3 mm ID) + Phenyl (10 mm x3 mm ID), dp 5 µm POPLC -Segmentkombination : C30 (200 mm x3 mm ID) + CN (90 mm x3 mm ID), dp 5 µm Mobile phase : MeOH / 2 mM NH ₄ Ac (80/20, v/v) Flussrate : 0,25mL/min ; 0,00 -12,00 min MeOH / 2 mM NH ₄ Ac (80/10, v/v) Flussrate : 0,25 mL/min ; 12,01 – 30,00 min Temperatur : 60°C | Analytische Säule : POPLC -Segmentkombination : C18 (20 mm x3 mm ID) + C30 (20 mm x3 mm ID) + CN (30 mm x3 mm ID) + Phenyl (10 mm x3 mm ID), dp 5 µm Mobile Phase : MeOH / 2mM NH ₄ Ac (78/22, v/v) Flussrate : 0,5 mL/min ; 15 min Temperatur : 60°C | Analytische Säule : POPLC -Segmentkombination : C18 (20 mm x3 mm ID) + C30 (20 mm x3 mm ID) + CN (30 mm x3 mm ID) + Phenyl (10 mm x3 mm ID), dp 5 µm Mobile Phase : MeOH / 2mM NH ₄ Ac (75/25, v/v) Flussrate : 0,9 mL/min ; 10 min Temperatur : 60°C |
| Detektion | Quattro Micro, Waters, USA Mode : ESI ⁺ Ciclosporin D : 1233,8 ► 1217,6 Ciclosporin A : 1119,9 ► 1203,0 Everolimus : 975,5 ► 908,6 Sirolimus : 931,8 ► 865,8 Desmethoxytelomus : 901,8 ► 834,7 Tacrolimus : 821,2 ► 768,3 Acycornon : 809,5 ► 756,4 | Quattro Micro, Waters, USA Mode : ESI ⁺ Ciclosporin D : 1233,8 ► 1217,6 Ciclosporin A : 1119,9 ► 1203,0 Everolimus : 975,5 ► 908,6 Sirolimus : 931,8 ► 865,8 Desmethoxytelomus : 901,8 ► 834,7 Tacrolimus : 821,2 ► 768,3 Acycornon : 809,5 ► 756,4 | Quattro Micro, Waters, USA Mode : ESI ⁺ Ciclosporin D : 1233,8 ► 1217,6 Ciclosporin A : 1119,9 ► 1203,0 Everolimus : 975,5 ► 908,6 Sirolimus : 931,8 ► 865,8 Desmethoxytelomus : 901,8 ► 834,7 Tacrolimus : 821,2 ► 768,3 Acycornon : 809,5 ► 756,4 |
| MS/MS | | | |
| Tuning Parameter | Quelle : Kapillarspannung : 3,5 kV Cone : variabel Quellentemperatur : 120 °C Desolvationstemperatur : 220 °C Cone Gasfluss : 40 L/h Desolvationsgasfluss : 600L/h Analysator : Kollision : variabel Ionenenergie 1 : 2,5 V LM / HM 1 Auflösung : 11,5 Ionenenergie 2 : 1,2 V LM / HM 2 Auflösung : 14 Eingang : -1 Ausgang : 1 Standardisierungsmisch (Konzentration je Analyt : 100ng/mL, gelöst in mobiler Phase 10 µL/min | Quelle : Kapillarspannung : 3,5kV Cone : variabel Quellentemperatur : 120 °C Desolvationstemperatur : 220 °C Cone Gasfluss : 40 L/h Desolvationsgasfluss : 600L/h Analysator : Kollision : variabel Ionenenergie 1 : 2,5 V LM / HM 1 Auflösung : 11,5 Ionenenergie 2 : 1,2 V LM / HM 2 Auflösung : 14 Eingang : -1 Ausgang : 1 Standardisierungsmisch (Konzentration je Analyt : 100ng/mL, gelöst in mobiler Phase 10 µL/min | Quelle : Kapillarspannung : 3,5 kV Cone : variabel Quellentemperatur : 120 °C Desolvationstemperatur : 220 °C Cone Gasfluss : 40 L/h Desolvationsgasfluss : 600L/h Analysator : Kollision : variabel Ionenenergie 1 : 2,5 V LM / HM 1 Auflösung : 11,5 Ionenenergie 2 : 1,2 V LM / HM 2 Auflösung : 14 Eingang : -1 Ausgang : 1 Standardisierungsmisch (Konzentration je Analyt : 100ng/mL, gelöst in mobiler Phase 10 µL/min |
| Infusionslösung | | | |
| Infusionsflussrate | | | |

5.2 Geräte und Materialien

MD-SPE-POPLC-MS/MS (-UV) und SPE-LC-MS/MS (-UV)

| | |
|-----------------------|---|
| Probengeber | Symbiosis™ Pharma (Spark Holland B.V., Emmen, NL) |
| HPLC-Pumpen | Symbiosis™ Pharma (Spark Holland B.V., Emmen, NL) |
| SPE-Einheit (ACE) | Symbiosis™ Pharma (Spark Holland B.V., Emmen, NL) |
| Hochdruckkolbenpumpen | Symbiosis™ Pharma (Spark Holland B.V., Emmen, NL) |
| Säulenofen | Mistral (Spark Holland, Emmen, NL) |
| Massenspektrometer | Quattro Micro™ (Micromass, Manchester, UK) |
| Interface | D-7000 Merck Hitachi (Merck KGaA, Darmstadt, D) |
| UV-Detektor | L-7400 Merck Hitachi (Merck KGaA, Darmstadt, D) |
| Software | MassLynx 4.1 (Waters Corporation, Milford, USA) |
| | Symbiosis™ Pharma for MassLynx (Spark Holland B.V., Emmen, NL) |
| | SparkLink 3.10 # 3 build 2 (Spark Holland B.V., Emmen, NL) |
| | D-7000 HSM version 4.1 Merck Hitachi (Merck KGaA, Darmstadt, D) |
| | POPLC Optimizer Software REV.1.04.07 (P/N MSCP-SOFT) (Bischoff Chromatography, Leonberg, D) |
| | Berechnungssoftware für pK_A -Werte: Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris |
| In-line Filter | FK7400, RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München, D) |
| Splitter | Graduated Micro-Splitter Valve 10-32 Grad, Ziemer Chromatographie, Langerwehe, D |

LC-MS/MS (Institut für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung)

| | |
|-----------------------|--|
| Probengeber | CTC Analytics (CTC Analytics, Zwingen, CH) |
| HPLC-Pumpen | Agilent Technologies 1200 Series (Agilent, Santa Clara, CA, USA) |
| Heizung für Wasserbad | Julabo Exatherm U3 electronic (Seelbach, D) |
| Massenspektrometer | MDS SCIEX API 5000 LC/MS/MS System with QJet Ion Guide (Concord, ON, Kanada) |
| Software | Analyst Software 1.4.2 |

SPE-Packungsmaterialien

HySphere C2 (10x2mm), dp 7µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

HySphere C8 (10x2mm), dp 8µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

HySphere C8 EC-SE (10x2mm), dp 10µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

HySphere C18 (10x2mm), dp 7µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

Oasis[®] HLB (10x2mm), dp 30µm (Waters Corporation, Milford, USA)

Oasis[®] MCX (10x2mm), dp 30µm (Waters Corporation, Milford, USA)

Oasis[®] WCX (10x2mm), dp 30µm (Waters Corporation, Milford, USA)

LiChrospher[®] ADS RP4 (10x2mm), dp 25µm (Merck KGaA, Darmstadt, D)

ProntoSil PLR (10x2mm), dp 10µm (Bischoff Chromatography, Leonberg, D)

Hybrid SPE[™]-Precipitation, 30mg/mL (10x2mm), (Supelco, Bellefonte, USA)

HySphere MM cation, (10x2mm), dp 12µm (Spark Holland B.V., Emmen, NL)

Strata NH₂, 100mg/mL, 55µm, 70Å (10x2mm) (Phenomenex, Torrance, USA)

Strata Si-1 Silica, 100mg/mL, 55µm, 70Å (10x2mm) (Phenomenex, Torrance, USA)

Analytische Trennsäulen

POPLC[®] Basic Kit 250-5 (Bischoff Chromatography, Leonberg, D)

LiChrospher[®] 100 RP 18-EC (125x2mm), dp 5µm (Ziemer, Langerwehe, D)

Sonstige Geräte und Materialien

| | |
|------------------|--|
| Waage | CP 225 D-OCE (Sartorius AG, Göttingen, D) |
| Zentrifugen | centrifuge 5415-D (Eppendorf AG, Leipzig, D) |
| | Hettich Universal (Bender & Hobein, München, D) |
| | Hettich Micro 22 (Bender & Hobein, München, D) |
| | Hettich Rotanta / (Bender & Hobein, München, D) |
| | Speed Vac Concentrator (Bachhofer, Reutlingen, D) |
| pH-Meter | Metrohm 691 (Deutsche Metrohm GmbH & Co.KG, Filderstadt, D) |
| Mikroskop | Lichtmikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D) |
| | LSM 510 Meta, Zeiss Konfokales Laser Elektronenmikroskop, (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, D) |
| Photometer | 1101 M (Eppendorf AG, Hamburg, D) |
| Ultraschallgerät | Sonorex (Bandelin electronic, Berlin, D) |
| Zählkammer | Neubauer improved bright-line (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf, D) |
| Wasserkocher | (Emide, Lohr am Main, D) |
| Hämatokrit- | |
| Versieglungskitt | Cat.No. 749510 (BRAND GmbH + Co.KG, Wertheim, D) |
| Glaskapillaren | 60 x 0,5mm I.D., No. 565 (Hecht Assistent, Sondheim, D) |

| | |
|-------------------------------------|---|
| | Blaubrand® intraMark Micropipetten, 100µL (Brand GmbH + Co.KG, Wertheim, D) |
| Probengefäße | zertifizierte Mikro-Schraubröhren mit Schraubverschlussverschraubt, Typ I, 2,0mL (Sarstedt, Nümbrecht, D) |
| Einsätze für Probengefäße | Vial 07-CPV (Chromacol, Welwyn Garden City, UK) |
| Tieffriergefäße | Cryoröhrchen CryoLine™ System, 3,8mL, (NUNC GmbH & Co.KG, Wiesbaden, D) |
| Atom-Absorptions-Spektrometer | Atom-Absorptions-Spektrometer 3110 (Perkin Elmer, Waltham, MA, U.S.A) |
| Multifunktions-analysengerät | Olympus AU 2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, D) |
| Filterkarten | GSK 903® Card (Whatman GmbH, Dassel, D) |
| Aufbewahrungsbeutel für Filterkarte | Multi Barrier Pouches (Whatman GmbH, Dassel, D) |
| Trocknungsmittel | Desiccant 1000 (Whatman GmbH, Dassel, D) |
| Trocknungsständer | 903® Dry Rak™ (Whatman GmbH, Dassel, D) |
| Stanzer | Eigenherstellung der Klinikumswerkstatt nach dem Vorbild von Harris Uni-Core 3.0mm Punch (Whatmann GmbH, Dassel, D) |

5.3 Chemikalien und Lösemittel

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| Ciclosporin A | Novartis International, Basel, CH |
| | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Ciclosporin D | Novartis International, Basel, CH |

| | |
|--------------------------------|--|
| Tacrolimus | Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, J |
| Ascomycin | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Sirolimus | Wyeth Research, Princeton, NJ, USA |
| Everolimus | Novartis International, Basel, CH |
| Desmethoxysirolimus | Wyeth Research, Princeton, NJ, USA |
| Acetonitril | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Methanol | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Wasser | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Ameisensäure | Merck KGaA, Darmstadt, D |
| Ammoniumacetat | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Dimethylsulfoxid | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Clin Cal [®] | RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München, D) |
| Clin Check [®] | RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, München, D) |
| Isotonische | |
| Kochsalzlösung | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D |
| Trypanblau-Lösung | Fluka, Steinheim, D |
| Drabkin's Reagenz | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| BCA [™] Protein Assay | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA |
| Micro BCA [™] | |
| Protein Assay | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA |
| Coomassie Plus-The Better | |
| Bradford Assay Kit | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA |
| Kupfersulfat | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Zinksulfat | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |

5.4 Geräteparameter

MRM-Übergänge aller Analyte und der Internen Standards:

- Ciclosporin A (m/z: 1220 ► 1203)
- Ciclosporin D (m/z: 1234 ► 1217)
- Everolimus (m/z: 976 ► 909)
- Sirolimus (m/z: 932 ► 864)
- Desmethoxysirolimus (m/z: 902 ► 835)
- Tacrolimus (m/z: 821 ► 769)
- Ascomycin (m/z: 810 ► 757)

Literaturverzeichnis

1. Christians U, Sewing KF, Herausgeber. Whole Blood Sample Clean-Up for Chromatographic Analysis: Elsevier Science Publishers B V, 1989. 0-444-88327-4
2. Morello R, Milojkovic J, Boos KS. SPE-LC-MS/MS analysis of immunosuppressants directly in whole blood using a unique in-line processing procedure. *Therapeutic Drug Monitoring* 2007;29(4):143.
3. Boos K-S, Morello R, Milojkovic J, Berger I. Durchbruch in der Analytik von Vollblut. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 2008:19-20.
4. Milojkovic J, Berger I, Morello R, Boos K-S. Ein neuartiges Verfahren für die direkte Applikation von Vollblut in Trenn- bzw. Detektionssysteme. *LC GC* 2009;07:5-8.
5. Mei H, Hsieh Y, Nardo C, Xu X, Wang S, Ng K, et al. Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003;17(1):97-103.
6. Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1999;13(12):1175-1185.
7. Milojkovic J. Entwicklung eines neuartigen Verfahrens für die direkte Injektion und in-line Prozessierung von Vollblutproben im Rahmen der LC-MS/MS-Analyse von Arzneistoffen. München: Ludwig-Maximilian-Universität München; 2009.
8. Georgi K. Multidimensionale Festphasenextraktion (MD-SPE) für die direkte, hochselektive Analyse basischer Pharmaka in biologischen Flüssigkeiten mittels LC-MS/MS. München: Ludwig-Maximilian-Universität München; 2006.
9. Cassiano N, Lima V, Oliveira R, de Pietro A, Cass Q. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006;385(8):1580-1580.
10. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen. 9. Auflage: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2008. 978-3-8047-1952-1.

11. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R. Physiologie. 5. Auflage: Urban & Fischer Verlag, 2008. 978-3-437-41318-6.
12. rode en witte bloedcel, [zitiert 16.04.2009], abrufbar von: www.web.ncifcrf.gov
13. Schmidt RF, Lang F. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 30. Auflage: Springer Medizin Verlag, 2007. 978-3-540-32908-4.
14. Lentner C. Geigy Scientific Tables. 8. Auflage. Basle, Switzerland: Ciba Geigy Corporation, 1984. 0-914168-52-5.
15. Dörner K. Taschenatlas der Klinischen Chemie. 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2006. 3-13-129716-6.
16. Christie WW. Phosphatidylcholine and related Lipids. [zitiert 26.03.2009]; abrufbar von: www.lipidlibrary.co.uk
17. Schwach G, Passow H. Preparation and properties of human erythrocyte ghosts. Molecular and Cellular Biochemistry 1973;2(2):197-218.
18. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Archives of Biochemistry and Biophysics 1963;100(1):119-130.
19. Ponder E, Barreto D. THE BIREFRINGENCE OF THE HUMAN RED CELL GHOSTS. Journal of General Physiology 1956 January 20, 1956;39(3):319-324.
20. Ponder E. On Properties of the Red Cell Ghost. Journal of Experimental Biology 1942 January 1, 1942;18(3):257-265.
21. O'Donnell JM, Ellory JC. Shape, volume and integrity of reconstituted human red cell ghosts. Cellular and Molecular Life Sciences 1969;25(5):529-530.
22. Mitchison JM. THICKNESS AND STRUCTURE OF THE MEMBRANE OF THE HUMAN RED CELL GHOST. Nature 1950;166(4217):347-348.
23. Rand RP, Burton AC. MECHANICAL PROPERTIES OF RED CELL MEMBRANE .I. MEMBRANE STIFFNESS + INTRACELLULAR PRESSURE. Biophysical Journal 1964;4(2):115-135.
24. Bodemann H, Passow H. Factors controlling the resealing of the membrane of human erythrocyte ghosts after hypotonic hemolysis. Journal of Membrane Biology 1972;8(1):1-26.
25. Dale GL, Villacorte DG, Beutler E. High-yield entrapment of proteins into erythrocytes. Biochemical Medicine 1977;18(2):220-225.

-
26. Zimmermann U, Riemann F, Pilwat G. Enzyme loading of electrically homogeneous human red blood cell ghosts prepared by dielectric breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1976;436(2):460-474.
 27. Rooney JA. SHEAR AS A MECHANISM FOR SONICALLY INDUCED BIOLOGICAL EFFECTS. *Journal of the Acoustical Society of America* 1972;52(6):1718-1724.
 28. Gershfeld NL, Murayama M. Thermal instability of red blood cell membrane bilayers: Temperature dependence of hemolysis. *Journal of Membrane Biology* 1988;101(1):67-72.
 29. Ponder E. Hemolysis and Related Phenomena. New York: Grune & Stratten, 1948.
 30. Hoffman JF. The Active Transport of Sodium by Ghosts of Human Red Blood Cells. *Journal of General Physiology* 1962 May 1, 1962;45(5):837-859.
 31. Wolf P. NATURE AND SIGNIFICANCE OF PLATELET PRODUCTS IN HUMAN PLASMA. *British Journal of Haematology* 1967;13(3):269-288.
 32. George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. ISOLATION OF HUMAN-PLATELET MEMBRANE MICROPARTICLES FROM PLASMA AND SERUM. *Blood* 1982;60(4):834-840.
 33. Simak J, Gelderman MP. Cell Membrane Microparticles in Blood and Blood Products: Potentially Pathogenic Agents and Diagnostic Markers. *Transfusion Medicine Reviews* 2006;20(1):1-26.
 34. Lutz HU, Liu S-C, Palek J. Release of Spectrin-Free Vesicles from Human Erythrocytes during ATP Depletion. I. Characterization of Spectrin-Free Vesicles. *The Journal of Cell Biology* 1977;73(3):548-560.
 35. Lutz HU. VESICLES ISOLATED FROM ATP-DEPLETED ERYTHROCYTES AND OUT OF THROMBOCYTE-RICH PLASMA. *Journal of Supramolecular Structure* 1978;8(3):375-389.
 36. Wagner GM, Chiu DTY, Qju JH, Heath RH, Lubin BH. SPECTRIN OXIDATION CORRELATES WITH MEMBRANE VESICULATION IN STORED RBCs. *Blood* 1987;69(6):1777-1781.
 37. Ott P, Hope MJ, Verkleij AJ, Roelofsen B, Brodbeck U, Van Deenen LLM. Effect of dimyristoyl phosphatidylcholine on intact erythrocytes. Release of spectrin-free vesicles without ATP depletion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1981;641(1):79-87.
 38. Rumsby MG, Trotter J, Allan D, Michell RH. Recovery of Membrane Micro-vesicles from Human Erythrocytes Stored for Transfusion: A Mechanism for the Erythrocyte Discocyte-to-Spherocyte Shape Transformation. *Biochemical Society Transaction* 1977;5:126-188.

39. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn F, Westendorp RGJ, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000;95(3):930-935.
40. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* 2003 August 1, 2003;59(2):277-287.
41. Allan D, Thomas P. CA-2+-INDUCED BIOCHEMICAL-CHANGES IN HUMAN-ERYTHROCYTES AND THEIR RELATION TO MICROVESICULATION. *Biochemical Journal* 1981;198(3):433-440.
42. Bucki R, Bachelot-Loza C, Zachowski A, Giraud F, Sulpice JC. Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry* 1998;37(44):15383-15391.
43. Colantuoni G, Heliums JD, Moake JL, Alfrey CP, Jr. THE RESPONSE OF HUMAN PLATELETS TO SHEAR STRESS AT SHORT EXPOSURE TIMES. *Transactions / American Society for Artificial Internal Organs* 1979;23:626-630.
44. Shukla SD, Berriman J, Coleman R, Finean JB, Michell RH. Membrane protein segregation during release of microvesicles from human erythrocytes. *FEBS Letters* 1978;90(2):289-292.
45. Armstrong MJ, Storch J, Dainiak N. Structurally distinct plasma membrane regions give rise to extracellular membrane vesicles in normal and transformed lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1988;946(1):106-112.
46. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99(9):2118-2127.
47. Weed RI, Bowdler AJ. METABOLIC DEPENDENCE OF CRITICAL HEMOLYTIC VOLUME OF HUMAN ERYTHROCYTES - RELATIONSHIP TO OSMOTIC FRAGILITY AND AUTOHEMOLYSIS IN HEREDITARY SPHEROCYTOSIS AND NORMAL RED CELLS. *Journal of Clinical Investigation* 1966;45(7):1137-1149.
48. Weed RI, Reed CF. Membrane alterations leading to red cell destruction. *The American Journal of Medicine* 1966;41(5):681-698.
49. Ham TH, Shen SC, Fleming EM, Castle WB. STUDIES ON THE DESTRUCTION OF RED BLOOD CELLS. IV: THERMAL INJURY: ACTION OF HEAT IN CAUSING INCREASED SPHEROIDICITY, OSMOTIC AND MECHANICAL FRAGILITIES AND HEMOLYSIS OF ERYTHROCYTES; OBSERVATIONS ON THE MECHANISMS OF DESTRUCTION OF SUCH ERYTHROCYTES IN DOGS AND IN A PATIENT WITH A FATAL THERMAL BURN. *Blood* 1948 April 1, 1948;3(4):373-403.
50. Ponder E. Shape and Shape Transformation of Heated Human Red Cells. *Journal of Experimental Biology* 1949 May 1, 1949;26(1):35-45.

-
51. Brandts JF, Erickson L, Lysko K, Schwartz AT, Taverna RD. Calorimetric studies of the structural transitions of the human erythrocyte membrane. The involvement of spectrin in the A transition. *Biochemistry* 1977;16(15):3450-3454.
 52. Lepock JR, Frey HE, Bayne H, Markus J. Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1989;980(2):191-201.
 53. Coakley WT, Bater AJ, Crum LA, Deeley JOT. Morphological changes, haemolysis and microvesicularization of heated human erythrocytes. *Journal of Thermal Biology* 1979;4(1):85-93.
 54. McDowall RD. Sample preparation for biomedical analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1989;492:3-58.
 55. McDowall RD, Doyle E, Murkitt GS, Picot VS. Sample preparation for the HPLC analysis of drugs in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1989;7(9):1087-1096.
 56. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 2003;75(13):3019-3030.
 57. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2003;785(2):263-275.
 58. Gilar M, Bouvier ESP, Compton BJ. Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods. *Journal of Chromatography A* 2001;909(2):111-135.
 59. Blanchard J. Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1981;226(2):455-460.
 60. Pschyrembel-Klinisches Wörterbuch. 254. Auflage. Berlin: Walter de Gruyter, 1982. 3-11-007187-8.
 61. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clinical Chemistry* 2003 Nov;49(11):1797-1817.
 62. Lindner M, M B, Hoffmann GF. Fachinformation Neugeborenenenscreening. Heidelberg: Medienzentrum, Stabstelle des Universitätsklinikums und der Medizinischen Fakultät Heidelberg, 2008.

63. Clague A, Thomas A. Neonatal biochemical screening for disease. *Clinica Chimica Acta* 2002;315(1-2):99-110.
64. Koal T, Burhenne H, Römling R, Svoboda M, Resch K, Kaever V. Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005;19(21):2995-3001.
65. AbuRuz S, Millership J, McElnay J. Dried blood spot liquid chromatography assay for therapeutic drug monitoring of metformin. *Journal of Chromatography B* 2006;832(2):202-207.
66. Lejeune D, Souletie I, Houzé S, Le bricon T, Le bras J, Gourmel B, et al. Simultaneous determination of monodesethylchloroquine, chloroquine, cycloguanil and proguanil on dried blood spots by reverse-phase liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007;43(3):1106-1115.
67. AbuRuz S, Al-Ghazawi M, Al-Hiari Y. A Simple Dried Blood Spot Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Lamotrigine. *Chromatographia*.
68. Unger KK, Weber E. *Handbuch der HPLC*. Darmstadt: GIT VERLAG GMBH, 1995. 3-92886519-6.
69. Hennion M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1999;856(1-2):3-54.
70. Lingeman H, McDowall RD, Brinkman UAT. Guidelines for bioanalysis using column liquid chromatography. *TRAC Trends in Analytical Chemistry* 1991;10(2):48-59.
71. Boos KS. How to set-up a LC-MS/MS platform for fully automated analysis of drugs and endogenous compounds in biofluids. *Analytica Vietnam*. Hanoi, Vietnam, 2009.
72. Xu RN, Fan L, Rieser MJ, El-Shourbagy TA. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007;44(2):342-355.
73. Von Behren D. Strategic and Tactical Benefits of Automated Sample Preparation. Sotax Corporation [zitiert 18.05.2009]; abrufbar von: www.sotax.com
74. Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda MJ, Barceló D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A* 2007;1152(1-2):97-115.
75. Schoenmakers P, Marriott P, Beens J. Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography. *LC GC Europe* 2003;16(6):335-339.
76. Majors RE. Multidimensional and comprehensive liquid chromatography. *LC GC North America* 2005;23(10):1074-1084.

-
77. Giddings JC. Two-dimensional separations: concept and promise. *Analytical Chemistry* 1984;56(12):1258A-1270A.
78. Huber JFK, Van Der Linden R, Ecker E, Oreans M. Column swithiching in high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1973;83:267-277.
79. Rudolphi A, Boos KS. The use of restricted-access media in HPLC .2. Applications. *LC GC-Magazine of Separation Science* 1997;15(9):814-823.
80. Georgi K, Boos K. Multidimensional On-Line SPE for Undisturbed LC-MS-MS Analysis of Basic Drugs in Biofluids. *Chromatographia* 2006;63(11):523-531.
81. Boos K-S, Fleischer C. Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 2001;371(1):16-20.
82. Majors RE, Boos KS, Grimm CH, Lubda D, Wieland G. Practical guidelines for HPLC-integrated sample preparation using column switching. *LC GC-Magazine of Separation Science* 1996;14(7):554-560.
83. Schellen A, Ooms B, van de Lagemaat D, Vreeken R, van Dongen WD. Generic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast determination of drugs in biological fluids. *Journal of Chromatography B* 2003;788(2):251-259.
84. Bones J, Thomas K, Nesterenko PN, Paull B. On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS. *Talanta* 2006;70(5):1117-1128.
85. Ferrer I, Barceló D. Validation of new solid-phase extraction materials for the selective enrichment of organic contaminants from environmental samples. *TRAC Trends in Analytical Chemistry* 1999;18(3):180-192.
86. Oasis HLB. [zitiert 21.04.2009]; abrufbar von: www.waters.com/webassets/cms/category/media/detail_page_images/oasisspe_detail_1.gif
87. Desilets CP, Rounds MA, Regnier FE. Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1991;544:25-39.
88. Mullett WM, Walles M, Levsen K, Borlak J, Pawliszyn J. Multidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by a molecularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2004;801(2):297-306.
89. Boos KS, Rudolphi A. The use of restricted-access media in HPLC .1. Classification and review. *LC GC-Magazine of Separation Science* 1997;15(7):602-611.

90. Boos K-S, Rudolphi A, Vielhauer S, Walfort A, Lubda D, Eisenbeiß F. Alkyl-Diol Silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1995;352(7):684-690.
91. LiChrospher ADS - Direkte Analytik kleiner Moleküle in biologischen Proben. Merck KGaA [zitiert 29.11.2008]; abrufbar von: <http://www.merck.de/chromatography>
92. Boos K-S, Morello R. LC-MS adequat clean-up of Biofluids. 25th Montreux Symposium on LC-MS. Montreux, Switzerland, 2008.
93. Oasis MCX und WCX. [zitiert 21.04.2009]; abrufbar von: www.waters.com/webassets/cms/category/media/detail_page_images/oasispe_detail_1.gif
94. Kostianen R, Kotiaho T, Kuuranne T, Auriola S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *Journal of Mass Spectrometry* 2003;38(4):357-372.
95. Neue UD, O'Gara JE, Méndez A. Selectivity in reversed-phase separations: Influence of the stationary phase. *Journal of Chromatography A* 2006;1127(1-2):161-174.
96. Nyiredy S, Szucs Z, Szepes L. Stationary-phase optimized selectivity LC (SOS-LC): Separation examples and practical aspects. *Chromatographia* 2006;63:S3-S9.
97. Lamotte S. Säulen aus Segmenten. *Nachrichten aus der Chemie* 2008;56:914-916.
98. Buszewski B, Jezierska-Switala M, Kowalska S. Stationary phase with specific surface properties for the separation of estradiol diastereoisomers. *Journal of Chromatography B* 2003;792(2):279-286.
99. Eppert GJ, Heitmann P. Selectivity optimization of stationary phases. *LC GC Europe* 2003;16(10):698-705.
100. Marple RL, LaCourse WR. Application of Photoassisted Electrochemical Detection to Explosive-Containing Environmental Samples. *Analytical Chemistry* 2005;77(20):6709-6714.
101. Welsch T, Dornberger U, Lerche D. SELECTIVITY TUNING OF SERIALY COUPLED COLUMNS IN HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY. *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* 1993;16(1):18-26.
102. Bischoff K, Nyiredy S, Szucs Z, inventors. Elements for Separating Substances by Distributing between a Stationary and a Mobile Phase, and Method for the Production of a Separating Device WO 2006/125564. 2006.
103. Nyiredy S, Szucs Z, Szepes L. Stationary phase optimized selectivity liquid chromatography: Basic possibilities of serially connected columns using the "PRISMA" principle. *Journal of Chromatography A* 2007;1157(1-2):122-130.

-
104. Lamotte S. The pillar segments. *Nachrichten aus der Chemie* 2008;56(9):914-916.
105. POPLC - Phase OPTimized Liquid Chromatography. *Bischoff Chromatography* [zitiert 01.06.2008]; abrufbar von: www.poplc.de
106. Nyiredy S, Meier B, Erdelmeier CAJ, Sticher O. PRISMA - A GEOMETRICAL DESIGN FOR SOLVENT OPTIMIZATION IN HPLC. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* 1985;8(4):186-188.
107. Nyiredy S, Dallenbach-Tölke K, Sticher O. The "PRISMA" Optimization System in Planar Chromatography. *Journal of Planar Chromatography* 1988;1:336-342.
108. Dooley KC. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. *Clinical Biochemistry* 2003;36(6):471-481.
109. Brewer E, Henion J. Atmospheric pressure ionization LC/MS/MS techniques for drug disposition studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998;87(4):395-402.
110. Taylor PJB. High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Therapeutic Drug Monitoring* 2005;27(6):689-693.
111. Fiedler GM, Ceglarek U, Lembcke J, Baumann S, Leichtle A, Thiery J. Anwendungsgebiete der Massenspektrometrie in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin / Application of mass spectrometry in clinical chemistry and laboratory medicine. *LaboratoriumsMedizin* 2004;28(3):185-194.
112. Syage JA, Short LC, Cai SS. Atmospheric pressure photoionization - The second source for LC-MS? *LC GC North America* 2008;26(3):286-296.
113. Bruins AP. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* 1998;794(1-2):345-357.
114. Gates P, Electrospray Ionisation (ESI), 2004, [zitiert 26.01.2009], abrufbar von: www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html
115. Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2000 July;35(7):804-817.
116. Cole RB. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2000;35(7):763-772.
117. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* 1968;49(5):2240-2249.
118. Iribarne JV, Thomson BA. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics* 1976;64(6):2287-2294.
119. Balogh MP. Ionization revisited. *LC GC North America* 2006;24(12):1284-1289.

120. Horning EC, Horning MG, Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. *Analytical Chemistry* 1973;45(6):936-943.
121. Gates P, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI), 2004, [zitiert 26.01.2009], abrufbar von: www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/apce-ionisation.html
122. Robb DB, Covey TR, Bruins AP. Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 2000;72(15):3653-3659.
123. User's Guide Quattro Micro. Waters Corporation.
124. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* 2005;38(4):328-334.
125. de Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry*. 3. Auflage: John Wiley and Sons, Ltd, 2007. 978-0-470-03310-4.
126. Marchi I, Rudaz S, Selman M, Veuthey J-L. Evaluation of the influence of protein precipitation prior to on-line SPE-LC-API/MS procedures using multivariate data analysis. *Journal of Chromatography B* 2007;845(2):244-252.
127. Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2003;14(11):1290-1294.
128. Buhrman DL, Price PI, Rudewicz PJ. Quantitation of SR 27417 in Human Plasma Using Electrospray Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: A Study of Ion Suppression. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1996;7(11):1099-1105.
129. Korfmacher WA. *Using mass spectrometry for drug metabolism studies*: CRC Press, 2004. 0-8493-1963-3.
130. Henion J, Brewer E, Rule G. Sample preparation for LC/MS/MS: Analyzing biological and environmental samples. *Analytical Chemistry* 1998;70(19):650A-656A.
131. Shah V, Midha K, Findlay J, Hill H, Hulse J, McGilveray I, et al. Bioanalytical Method Validation-A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research* 2000;17(12):1551-1557.
132. *Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) 2001. [zitiert 10.09.2009]; abrufbar von: www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf

-
133. Kebarle P, Tang L. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 1993;65(22):972A-986A.
134. King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2000;11(11):942-950.
135. A Guide to Effective Method Development in Bioanalysis. 2008. [zitiert 27.03.2009]; abrufbar von: www.waters.com/bioanalysis
136. Shen JX, Motyka RJ, Roach JP, Hayes RN. Minimization of ion suppression in LC-MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005;37(2):359-367.
137. Annesley TM. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2003 July 1, 2003;49(7):1041-1044.
138. Jemal M, Rao S, Gatz M, Whigan D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric quantitative determination of the HIV protease inhibitor atazanavir (BMS-232632) in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC): practical approaches to PBMC preparation and PBMC assay design for high-throughput analysis. *Journal of Chromatography B* 2003;795(2):273-289.
139. Rossi DT. The impact of atmospheric pressure ionization. New York: Marcel Dekker, 2002. 0-8247-0607-2.
140. Bogusz MJ, Enazi EA, Hassan H, Abdel-Jawaad J, Ruwaily JA, Tufail MA. Simultaneous LC-MS-MS determination of cyclosporine A, tacrolimus, and sirolimus in whole blood as well as mycophenolic acid in plasma using common pretreatment procedure. *Journal of Chromatography B* 2007;850(1-2):471-480.
141. Little JL, Wempe MF, Buchanan CM. Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ionization effects in plasma. *Journal of Chromatography B* 2006;833(2):219-230.
142. Wu ST, Schoener D, Jemal M. Plasma phospholipids implicated in the matrix effect observed in liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalysis: evaluation of the use of colloidal silica in combination with divalent or trivalent cations for the selective removal of phospholipids from plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008;22(18):2873-2881.
143. Meng M, Bennett P. A Source for Imprecision Resulting from Ionization Suppression from Strongly Retained Phospholipids and Dioctyl Phthalate. ASMS Conference; 2004; Nashville, Tennessee, U.S.A.: Tandem Labs; 2004.
144. Bennett PK, Ment M, Capka V. Managing Phospholipid-Based Matrix Effects in Bioanalysis. Tandem Labs [zitiert 22.02.2009]; abrufbar von: www.tandemlabs.com/documents/IMSC_06_Web.pdf

145. Pascoe R, Foley JP, Gusev AI. Reduction in Matrix-Related Signal Suppression Effects in Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using On-Line Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* 2001;73(24):6014-6023.
146. Miller-Stein C, Bonfiglio R, Olah TV, King RC. Rapid Method Development of Quantitative LC-MS/MS Assay for Drug Discovery. *American Pharmaceutical Review* 2000;3:54-61.
147. Matuszewski BK. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B* 2006;830(2):293-300.
148. Heller DN. Ruggedness testing of quantitative atmospheric pressure ionization mass spectrometry methods: the effect of co-injected matrix on matrix effects. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007;21(5):644-652.
149. Lagerwerf FM, van Dongen WD, Steenvoorden RJJM, Honing M, Jonkman JHG. Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS-MS. *TRAC Trends in Analytical Chemistry* 2000;19(7):418-427.
150. Tiller PR, Romanyshyn LA. Implications of matrix effects in ultra-fast gradient or fast isocratic liquid chromatography with mass spectrometry in drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002;16(2):92-98.
151. Avery MJ. Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003;17(3):197-201.
152. Deng Y, Zhang H, Wu J-T, Olah TV. Tandem mass spectrometry with online high-flow reversed-phase extraction and normal-phase chromatography on silica columns with aqueous-organic mobile phase for quantitation of polar compounds in biological fluids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005;19(20):2929-2934.
153. Taylor PJB. Internal Standard Selection for Immunosuppressant Drugs Measured by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring* 2007;29(1):131-132.
154. Stokvis E, Rosing H, Beijnen JH. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005;19(3):401-407.
155. Taylor PJ, Brown SR, Cooper DP, Salm P, Morris MR, Pillans PI, et al. Evaluation of 3 Internal Standards for the Measurement of Cyclosporin by HPLC-Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2005 October 1, 2005;51(10):1890-1893.
156. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Mass interferences in quantification of cyclosporine using tandem mass spectrometry without chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring* 2003;25(4):80.

-
157. O'Halloran S, Ilett KF. Evaluation of a Deuterium-Labeled Internal Standard for the Measurement of Sirolimus by High-Throughput HPLC Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2008 August 1, 2008;54(8):1386-1389.
158. Vogeser M. Instrument-Specific Matrix Effects of Calibration Materials in the LC-MS/MS Analysis of Tacrolimus. *Clinical Chemistry* 2008 August 1, 2008;54(8):1406-1408.
159. Jemal M, Schuster A, Whigan DB. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003;17(15):1723-1734.
160. Sancho JV, Pozo OJ, López FJ, Hernández F. Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002;16(7):639-645.
161. Hinderling PH. Red Blood Cells: A Neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Pharmacological Reviews* 1997 September 1, 1997;49(3):279-295.
162. Herdegen T. *Kurzlehrbuch Pharmakologie*: Georg Thieme Verlag KS, 2008. 978-3-13-142201-0.
163. Vollmar A, Dingermann T. *Immunologie*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2005. 3-8047-2189-3.
164. Fruman D, Burakoff S, Bierer B. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB Journal* 1994 April 1, 1994;8(6):391-400.
165. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology Today* 1992;13(4):136-142.
166. Kahan BD. DRUG-THERAPY - CYCLOSPORINE. *New England Journal of Medicine* 1989;321(25):1725-1738.
167. Land WG. *Immunsuppressive Therapie*: Georg Thieme Verlag, 2006. 3-13-133621-8.
168. Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer Immunosuppressive Drugs: A Review. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999 June 1, 1999;10(6):1366-1380.
169. Lindholm A, Kahan BD. INFLUENCE OF CYCLOSPORINE PHARMACOKINETICS, TROUGH CONCENTRATIONS, AND AUC MONITORING ON OUTCOME AFTER KIDNEY-TRANSPLANTATION. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1993;54(2):205-218.
170. Rupperecht H. *Immunsuppression*: Elsevier, Urban und Fischer Verlag, 2005. 3-437-23920-1.

171. Faulds D, Goa KL, Benfield P. CYCLOSPORINE - A REVIEW OF ITS PHARMACODYNAMIC AND PHARMACOKINETIC PROPERTIES, AND THERAPEUTIC USE IN IMMUNOREGULATORY DISORDERS. *Drugs* 1993;45(6):953-1040.
172. Mancinelli LM, Frassetto L, Floren LC, Dressler D, Carrier S, Bekersky I, et al. The pharmacokinetics and metabolic disposition of tacrolimus: A comparison across ethnic groups. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2001;69(1):24-31.
173. Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, Joergensen J, Meerloo T, Sedrani R, et al. SDZ RAD, a new rapamycin derivative - Synergism with cyclosporine. *Transplantation* 1997;64(1):32-35.
174. Nashan B. Early Clinical Experience With a Novel Rapamycin Derivative. *Therapeutic Drug Monitoring* 2002;24(1):53-58.
175. Stepkowski SM, Napoli KL, Wang ME, Qu XM, Chou TC, Kahan BD. Effects of the pharmacokinetic interaction between orally administered sirolimus and cyclosporine on the synergistic prolongation of heart allograft survival in rats. *Transplantation* 1996;62(7):986-994.
176. Kimball PM, Kerman RH, Kahan BD. PRODUCTION OF SYNERGISTIC BUT NONIDENTICAL MECHANISMS OF IMMUNOSUPPRESSION BY RAPAMYCIN AND CYCLOSPORINE. *Transplantation* 1991;51(2):486-490.
177. Longoria J, Roberts RF, Marboe CC, Stouch BC, Starnes VA, Barr ML. Sirolimus (rapamycin) potentiates cyclosporine in prevention of acute lung rejection. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1999;117(4):714-718.
178. McAlister VC, Gao Z, Peltekian K, Domingues J, Mahalati K, MacDonald AS. Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. *The Lancet* 2000;355(9201):376-377.
179. Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, Neylan J, Rapamune Study G. Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in Caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: A phase II trial. *Transplantation* 1999;68(10):1526-1532.
180. Hausen B, Ikonen T, Briffa N, Berry GJ, Christians U, Robbins RC, et al. Combined immunosuppression with cyclosporine (Neoral) and SDZ RAD in non-human primate lung transplantation: Systematic pharmacokinetic-based trials to improve efficacy and tolerability. *Transplantation* 2000;69(1):76-86.
181. Vu MD, Qi SJ, Xu DS, Wu JP, Fitzsimmons WE, Sehgal SN, et al. Tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) in combination are not antagonistic but produce extended graft survival in cardiac transplantation in the rat. *Transplantation* 1997;64(12):1853-1856.

-
182. Qi SJ, Xu DS, Peng JZ, Vu MD, Wu JP, Bekersky I, et al. Effect of tacrolimus (FK506) and sirolimus (rapamycin) mono- and combination therapy in prolongation of renal allograft survival in the monkey. *Transplantation* 2000;69(7):1275-1283.
183. Aktories KI, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage: Urban & Fischer, 2005. 3-437-42521-8.
184. Taxis K, Kloft C. Interaktionsproblematik in der Pharmakotherapie mit Immunsuppressiva: Was ist klinisch relevant? *Pharmazie in Unserer Zeit* 2005;34(4):332-343.
185. Lo A, Burckart G. P-glycoprotein and drug therapy in organ transplantation. *Journal of Clinical Pharmacology* 1999 October 1, 1999;39(10):995-1005.
186. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clinical Pharmacokinetics* 2002;41(11):813-851.
187. Lindholm A, Sawe J. Pharmacokinetics and Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants. *Therapeutic Drug Monitoring* 1995;17(6):570-573.
188. Lindholm A. Factors Influencing the Pharmacokinetics of Cyclosporine in Man. *Therapeutic Drug Monitoring* 1991;13(6):465-477.
189. Johnston A, Marsden JT, Holt DW. THE INFLUENCE OF HEMATOCRIT ON BLOOD CYCLOSPORIN MEASUREMENTS IN VIVO. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1988;25(1):P132-P133.
190. Noble S, Markham A. CYCLOSPORINE - A REVIEW OF THE PHARMACOKINETIC PROPERTIES, CLINICAL EFFICACY AND TOLERABILITY OF A MICROEMULSION-BASED FORMULATION (NEORAL). *Drugs* 1995;50(5):924-941.
191. Zimmerman JJ, Kahan BD. Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *Journal of Clinical Pharmacology* 1997;37(5):405-415.
192. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clinical Pharmacokinetics* 1995;29(6):404-430.
193. Zahir HP, McCaughan GMP, Gleeson MRN, Nand RAP, McLachlan AJP. Changes in Tacrolimus Distribution in Blood and Plasma Protein Binding Following Liver Transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring* 2004;26(5):506-515.
194. Chow FS, Piekoszewski W, Jusko WJ. Effect of hematocrit and albumin concentration on hepatic clearance of tacrolimus (FK506) during rabbit liver perfusion. *Drug Metabolism and Disposition* 1997;25(5):610-616.
195. Zahir H, McCaughan G, Gleeson M, Nand RA, McLachlan AJ. Factors affecting variability in distribution of tacrolimus in liver transplant recipients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2004;57(3):298-309.

196. Machida M, Takahara S, Ishibashi M, Hayashi M, Sekihara T, Yamanaka H. EFFECT OF TEMPERATURE AND HEMATOCRIT ON PLASMA-CONCENTRATION OF FK-506. Transplantation Proceedings 1991;23(6):2753-2754.
197. Beysens AJ, Wijnen RMH, Beuman GH, Vanderheyden J, Kootstra G, Vanas H. FK-506 - MONITORING IN PLASMA OR IN WHOLE-BLOOD. Transplantation Proceedings 1991;23(6):2745-2747.
198. Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Tokuma Y, Hata T, et al. Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. Drug Metabolism and Disposition 1995 January 1, 1995;23(1):28-34.
199. Zimmerman J, Ferron G, Lim H, Parker V. The effect of a high-fat meal on the oral bioavailability of the immunosuppressant sirolimus (rapamycin). Journal of Clinical Pharmacology 1999 November 1, 1999;39(11):1155-1161.
200. Yatscoff R, Legatt D, Keenan R, Chackowsky P. BLOOD DISTRIBUTION OF RAPAMYCIN. Transplantation 1993;56(5):1202-1206.
201. Kovarik JM, Kahan BD, Kaplan B, Lorber M, Winkler M, Rouilly M, et al. Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: Pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine. Clinical Pharmacology and Therapeutics 2001;69(1):48-56.
202. Hallenbach J. Klinische Chemie für den Einstieg: Georg Thieme Verlag, 2001. 3-13-106341-6.
203. Benet LZ. Relevance of pharmacokinetics in narrow therapeutic index drugs. Transplantation Proceedings 1999;31(3):1642-1644.
204. Kahan BD. High variability of drug exposure: a biopharmaceutic risk factor for chronic rejection. Transplantation Proceedings 1998;30(5):1639-1641.
205. Rowland M. Plasma Protein Binding and Therapeutic Drug Monitoring. Therapeutic Drug Monitoring 1980;2(1):29-38.
206. Belitsky P, Dunn S, Johnston A, Levy G. Impact of absorption profiling on efficacy and safety of cyclosporin therapy in transplant recipients. Clinical Pharmacokinetics 2000;39(2):117-125.
207. Mahalati K, Belitsky P, Kiberd B, West K, Fraser A, MacDonald AS, et al. Absorption profiling - A novel method for monitoring Neoral in kidney transplantation that reduces rejection and nephrotoxicity. Transplantation 2000;69(8):12.
208. Shaw L, Yatscoff R, Bowers L, Freeman D, Jeffery J, Keown P, et al. Canadian Consensus Meeting on cyclosporine monitoring: report of the consensus panel. Clinical Chemistry 1990 October 1, 1990;36(10):1841-1846.

-
209. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, McMaster P, Wong SH, Zylber-Katz E, et al. Consensus Document: Therapeutic Monitoring of Tacrolimus (FK-506). *Therapeutic Drug Monitoring* 1995;17(6):606-614
210. Yatscoff RW, Boeckx R, Holt DW, Kahan BD, LeGatt DF, Sehgal S, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring of Rapamycin: Report of the Consensus Panel. *Therapeutic Drug Monitoring* 1995;17(6):676-680.
211. Holt DW, Armstrong VW, Griesmacher A, Morris RG, Napoli KL, Shaw LM. International Federation of Clinical Chemistry/International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Working Group on Immunosuppressive Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring* 2002;24(1):59-67.
212. Sandimmun Optoral-Produktmonographie. 2001. Novartis Pharma GmbH. Nürnberg
213. Certican Tabletten-Fachinformation. 2004. Novartis Pharma GmbH. Wien, Österreich
214. Prograf Hartkapseln-Fachinformation. 2006. Rote Liste Service GmbH. Berlin
215. Rapamune 1mg/mL Lösung-Fachinformation. 2007. Rote Liste Service GmbH. Berlin
216. Holt DW, Johnston A. Monitoring Immunosuppressive Drugs: Has It a Future? *Therapeutic Drug Monitoring* 2004;26(3):244-247.
217. Oellerich M, Armstrong VW, Streit F, Weber L, Tönshoff B. Immunosuppressive drug monitoring of sirolimus and cyclosporine in pediatric patients. *Clinical Biochemistry* 2004;37(6):424-428.
218. Belitsky P, Levy GA, Johnston A. Neoral absorption profiling: An evolution in effectiveness. *Transplantation Proceedings* 2000;32(3A):45S-52S.
219. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. 2002. p. 330-350.
220. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, et al. Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel. *Therapeutic Drug Monitoring* 1995;17(6):642-654
221. Dusci LJ, Hackett LP, Chiswell GM, Ilett KF. Comparison of Cyclosporine Measurement in Whole Blood by High-Performance Liquid Chromatography, Monoclonal Fluorescence Polarization Immunoassay, and Monoclonal Enzyme-Multiplied Immunoassay. *Therapeutic Drug Monitoring* 1992;14(4):327-332.
222. Amini H, Ahmadiani A. Simple determination of cyclosporine in human whole blood by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2003;795(2):209-214.

223. Napoli KL. A practical guide to the analysis of sirolimus using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Clinical Therapeutics* 2000;22(Supplement 2):B14-B24.
224. Baldelli S, Murgia S, Merlini S, Zenoni S, Perico N, Remuzzi G, et al. High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for therapeutic drug monitoring of everolimus. *Journal of Chromatography B* 2005;816(1-2):99-105.
225. Christians U, Braun F, Schmidt M, Kosian N, Schiebel H, Ernst L, et al. Specific and sensitive measurement of FK506 and its metabolites in blood and urine of liver-graft recipients. *Clinical Chemistry* 1992 October 1, 1992;38(10):2025-2032.
226. Taylor P, Jones A, Balderson G, Lynch S, Norris R, Pond S. Sensitive, specific quantitative analysis of tacrolimus (FK506) in blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 1996 February 1, 1996;42(2):279-285.
227. Salm P, Taylor PJ, Lynch SV, Warnholtz CR, Pillans PI. A rapid HPLC-mass spectrometry cyclosporin method suitable for current monitoring practices. *Clinical Biochemistry* 2005;38(7):667-673.
228. Keevil BG, McCann SJ, Cooper DP, Morris MR. Evaluation of a rapid micro-scale assay for tacrolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry* 2002;39:487-492.
229. Wallemacq PE, Vanbinst R, Asta Sp, Cooper DP. High-Throughput Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Analysis of Sirolimus in Whole Blood. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003;41(7):921-925.
230. Taylor PJ, Johnson AG. Quantitative analysis of sirolimus (Rapamycin) in blood by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1998;718(2):251-257.
231. Taylor PJ, Franklin ME, Graham KS, Pillans PI. A HPLC-mass spectrometric method suitable for the therapeutic drug monitoring of everolimus. *Journal of Chromatography B* 2007;848(2):208-214.
232. Korecka MP, Solari SGMD, Shaw LMP. Sensitive, High Throughput HPLC-MS/MS Method With On-line Sample Clean-up for Everolimus Measurement. *Therapeutic Drug Monitoring* 2006;28(4):484-490.
233. Koal T, Deters M, Casetta B, Kaever V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2004;805(2):215-222.
234. Yang Z, Peng Y, Wang S. Immunosuppressants: Pharmacokinetics, methods of monitoring and role of high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2005/12//;5(6):405-430.

-
235. Deters M, Kirchner G, Resch K, Kaever V. Simultaneous Quantification of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus and Cyclosporine by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2002;40(3):285-292.
236. Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Routine Method for Simultaneous Determination of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus, and Cyclosporin A in Whole Blood. *Clinical Chemistry* 2002 June 1, 2002;48(6):955-958.
237. Christians U, Jacobsen W, Serkova N, Benet LZ, Vidal C, Sewing K-F, et al. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2000;748(1):41-53.
238. Christians U, Braun F, Schmidt M, Kosian N, Schiebel HM, Ernst L, et al. SPECIFIC AND SENSITIVE MEASUREMENT OF FK506 AND ITS METABOLITES IN BLOOD AND URINE OF LIVER-GRAFT RECIPIENTS. *Clinical Chemistry* 1992 Oct;38(10):2025-2032.
239. Sketris I, Yatscoff R, Keown P, Canafax DM, First MR, Holt DW, et al. Optimizing the use of cyclosporine in renal transplantation. *Clinical Biochemistry* 1995;28(3):195-211.
240. Koseki N, Nakashima A, Nagae Y, Masuda N. Simultaneous quantitative determination of cyclosporine A and its three main metabolites (AM1, AM4N and AM9) in human blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a rapid sample processing method. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006;20(5):733-740.
241. Chen Y-L, Hirabayashi H, Akhtar S, Pelzer M, Kobayashi M. Simultaneous determination of three isomeric metabolites of tacrolimus (FK506) in human whole blood and plasma using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2006;830(2):330-341.
242. Streit F, Christians U, Schiebel H, Napoli K, Ernst L, Linck A, et al. Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray- mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 1996 September 1, 1996;42(9):1417-1425.
243. Volosov A, Napoli KL, Soldin SJ. Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography-tandem mass-spectrometry. *Clinical Biochemistry* 2001;34(4):285-290.
244. Taylor PJ, Salm P, Lynch SV, Pillans PI. Simultaneous Quantification of Tacrolimus and Sirolimus, in Human Blood, by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring* 2000;22(5):608-612.
245. Salm P, Taylor PJ, Clark A, Balderson GA, Grygotis A, Norris RLG, et al. High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry as a Reference for Analysis

of Tacrolimus to Assess Two Immunoassays in Patients With Liver and Renal Transplants. *Therapeutic Drug Monitoring* 1997;19(6):694-700.

246. Salm P, Taylor PJ, Pillans PI. Analytical Performance of Microparticle Enzyme Immunoassay and HPLC-Tandem Mass Spectrometry in the Determination of Sirolimus in Whole Blood. *Clinical Chemistry* 1999 December 1, 1999;45(12):2278-2280.

247. Taylor PJ. Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressant Drugs by High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Therapeutic Drug Monitoring* 2004;26(2):215-219.

248. Oellerich M, Armstrong VW. The Role of Therapeutic Drug Monitoring in Individualizing Immunosuppressive Drug Therapy: Recent Developments. *Therapeutic Drug Monitoring* 2006;28(6):719-725.

249. Deters M, Kaever V, Kirchner GI. Liquid chromatography/mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Analytica Chimica Acta* 2003;492(1-2):133-145.

250. Lieber M, Steck T. A description of the holes in human erythrocyte membrane ghosts. *Journal of Biological Chemistry* 1982 October 10, 1982;257(19):11651-11659.

251. Lieber M, Steck T. Dynamics of the holes in human erythrocyte membrane ghosts. *Journal of Biological Chemistry* 1982 October 10, 1982;257(19):11660-11666.

252. Schultze M. Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 1865;1:1-42.

253. Rakow AL, Hochmuth RM. THERMAL TRANSITION IN HUMAN ERYTHROCYTE-MEMBRANE - EFFECT ON ELASTICITY. *Biorheology* 1975;12(1):1-3.

254. Jayachandran M, Litwiller RD, Owen WG, Heit JA, Behrenbeck T, Mulvagh SL, et al. Characterization of blood borne microparticles as markers of premature coronary calcification in newly menopausal women. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2008 September 1, 2008;295(3):H931-938.

255. Coakley WT, Owen J, Deeley T. Effects of ionic strength, serum protein and surface charge on membrane movements and vesicle production in heated erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1980;602(2):355-375.

256. Symbiosis Pharma System, [zitiert 22.02.09], abrufbar von: www.sparkholland.com

257. Koster E. Considerations for Carry-Over in LC-MS Analysis of Biological Samples. *The Peak* 2005;8:5-15.

258. On-line SPE & LC-MS Training, Spark Holland, Emmen, Netherlands

-
259. Koster E, Ooms B, Sarlin F, Giaquinta B. Développements récents en SPE en ligne appliquée à l'HPLC et la LC-MS en bioanalyse. *Spectra analyse* 2002;31(229):19-21.
260. Boos K-S, Grimm C-H. High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. *TRAC Trends in Analytical Chemistry* 1999;18(3):175-180.
261. Vogeser M, Spöhrer U. Automated processing of whole blood samples for the determination of immunosuppressants by liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2006;44(9):1126-1130.
262. Segarra I, Brazelton TR, Guterman N, Hausen B, Jacobsen W, Morris RE, et al. Development of a high-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric assay for the specific and sensitive quantification of the novel immunosuppressive macrolide 40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1998;720(1-2):179-187.
263. Ceglarek U, Lembcke J, Martin Fiedler G, Werner M, Witzigmann H, Peter Hauss J, et al. Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 2004;346(2):181-190.
264. Müller C, Schäfer P, Störtzel M, Vogt S, Weinmann W. Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002;773(1):47-52.
265. Briem S, Eklund E, Williams G, Brunvoll J. Comparison of three methods for pharmacokinetic screening in rats using LC-MS-MS. *Chromatographia* 2002;55(0):S35-S39.
266. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B* 2009;877(23):2198-2207.
267. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B* 2007;852(1-2):22-34.
268. Jemal M, Xia Y-Q. The need for adequate chromatographic separation in the quantitative determination of drugs in biological samples by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1999;13(2):97-106.
269. Cushman-Vokoun AM, Plath KB, Landmark JD, Stickle DF. Predicted influence of sample hematocrit on injected mass of internal standard in mass spectrometry assays utilizing simple protein precipitation for sample preparation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2007;45(2):215-219.

270. Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris.
271. Buech G, Bertelmann E, Pleyer U, Siebenbrodt I, Borchert H-H. Formulation of Sirolimus Eye Drops and Corneal Permeation Studies. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2007;23:292-303.
272. Majors RE. Sample preparation for large-scale protein purification. *LC GC Europe* 2006;19(2):82-90.
273. Raynie DE. Modern Extraction Techniques. *Analytical Chemistry* 2004;76(16):4659-4664.
274. Asperger A, Efer J, Koal T, Engewald W. Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation. *Journal of Chromatography A* 2002;960(1-2):109-119.
275. Hatsis P, Volmer DA. Evaluation of a cyano stationary phase for the determination of tacrolimus, sirolimus and cyclosporin A in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2004;809(2):287-294.
276. Lamotte S. Optimising HPLC disconnections over the stationary phase. *Nachrichten aus der Chemie* 2006;54(4):439-440.
277. Armstrong VW, Streit F. Drug Monitoring of Sirolimus and Everolimus/Drug-Monitoring von Sirolimus und Everolimus. *LaboratoriumsMedizin* 2003;27(5-6):222-227.
278. Vogeser M, Spöhrer U. Pitfall in the high-throughput quantification of whole blood cyclosporin A using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2005;43(4):400-402.
279. Cech NB, Enke CG. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* 2001;20(6):362-387.
280. Bowers LD, Mathews SE. Investigation of the mechanism of peak broadening observed in the high-performance liquid chromatographic analysis of cyclosporine. *Journal of Chromatography A* 1985;333:231-238.
281. Nishikawa T, Hasumi H, Suzuki S, Kubo H, Ohtani H. Kinetic Analysis of Molecular Interconversion of Immunosuppressant FK506 by High-Performance Liquid Chromatography. *Pharmaceutical Research* 1993;10(12):1785-1789.
282. Namiki Y, Kihara N, Koda S, Hane K, Yasuda T. TAUTOMERIC PHENOMENON OF A NOVEL POTENT IMMUNOSUPPRESSANT (FK506) IN SOLUTION .1. ISOLATION AND STRUCTURE DETERMINATION OF TAUTOMERIC COMPOUNDS. *Journal of Antibiotics* 1993;46(7):1149-1155.

-
283. Mao Y, Carr PW. Adjusting Selectivity in Liquid Chromatography by Use of the Thermally Tuned Tandem Column Concept. *Analytical Chemistry* 1999;72(1):110-118.
284. Wang CP, Chan KW, Schiksnis RA, Scatina J, Sisenwine SF. High Performance Liquid Chromatographic Isolation, Spectroscopic Characterization, and Immunosuppressive Activities of Two Rapamycin Degradation Products. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1994;17(16):3383 - 3392.
285. Al-Uzri A, Yorgin PD, Kling PJ. Anemia in children after transplantation: etiology and the effect of immunosuppressive therapy on erythropoiesis. *Pediatric Transplantation* 2003;7(4):253-264.
286. Crum LA, Coakley WT, Deeley JOT. Instability development in heated human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1979;554(1):76-89.
287. Wood BR, Hammer L, Davis L, McNaughton D. Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes. *Journal of Biomedical Optics* 2005;10(1):014005-014013.
288. Lerche D, Baumler H. MODERATE HEAT-TREATMENT OF ONLY RED-BLOOD-CELLS (RBC) SLOWS DOWN THE RATE OF RBC-RBC AGGREGATION IN PLASMA. *Biorheology* 1984;21(3):393-403.
289. Lundy J. Dextran in supportive therapy. *Archives of Surgery* 1950;61:55-61.
290. Bennett P, Meng M, Van Horne KC. Identification of Plasma Components Resulting in Significant Matrix Effects in Negative Ion ESI-MS/MS. *Tandem Labs* 2005. [zitiert 22.02.2009]; abrufbar von: www.tandemlabs.com/documents/PatReport.pdf
291. Beipackzettel Cellclean. 2007. Sysmex Europe GmbH.
292. Gebrauchsanweisung Automatischer Hämatologie-Analysator XE-5000. 2007. Sysmex Corporation.
293. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry* 1951 November 1, 1951;193(1):265-275.
294. Bedienungsanleitung-Modified Lowry Protein Assay Kit. Pierce Biotechnology 2008. [zitiert 28.05.2007]; abrufbar von: www.piercenet.com/files/0229as8.pdf
295. Bedienungsanleitung- Coomassie Plus-The Better Bradford Assay Kit. 2004. [zitiert 03.06.2007]; abrufbar von: www.piercenet.com/files/0389as8.pdf
296. Bedienungsanleitung-BCA Protein Assay Kit. Pierce Biotechnology 2005. [zitiert 29.04.2007]; abrufbar von: www.piercenet.com/files/1296as8.pdf

297. Bedienungsanleitung- Micro BCA Protein Assay Kit. 2008. [zitiert 08.04.2007]; abrufbar von: www.piercenet.com/files/0412as8.pdf
298. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72(1-2):248-254.
299. Schlabach TD. Postcolumn detection of serum proteins with the biuret and Lowry reactions. *Analytical Biochemistry* 1984;139(2):309-315.
300. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* 1988;175(1):231-237.
301. Kessler RJ, Fanestil DD. Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1986;159(1):138-142.
302. Eichberg J, Mokrasch LC. Interference by oxidized lipids in the determination of protein by the lowry procedure. *Analytical Biochemistry* 1969;30(3):386-390.
303. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry* 1989;180(1):136-139.
304. Polyetheretherketon, [zitiert 02.10.2009], abrufbar von: www.auer-kunststofftechnik.de
305. Wärmeleitfähigkeit-Metalle, [zitiert 02.10.2009], abrufbar von: www.schweizer-fn.de/stoff/wleit_metall/v2_wleit_metall.html
306. Boos K-S, Morello R. High SPEEd Seminar. München, 2008.
307. Schlosser G, Stefanescu R, Przybylski M, Murariu M, Hudecz F, Drochioiu G. Copper-induced oligomerization of peptides: a model study. *European Journal of Mass Spectrometry* 2007;13(5):331-337.
308. ICH Harmonised Tripartite Guideline-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
309. Multilevel-Kalibratoren und Startup-Zubehör. [zitiert 10.02.2010]; abrufbar von: www.chromsystems.de/Betellinformationen.1072.0html?&L=1%250D
310. ClinCal Kalibratormaterialien. [zitiert 10.02.2010]; abrufbar von: www.recipe.de/de/products_qa_cal_9933.html
311. Vogeser M, Fleischer C, Meiser B, Groetzner J, Spöhrer U, Seidel D. Quantification of Sirolimus by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using On-Line Solid-Phase Extraction. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2002;40(1):40-45.

312. Hoogtanders K, van der Heijden J, Christiaans M, Edelbroek P, van Hooff JP, Stolk LML. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus with the dried blood spot method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007;44(3):658-664.
313. van der Heijden J, de Beer Y, Hoogtanders K, Christiaans M, de Jong GJ, Neef C, et al. Therapeutic drug monitoring of everolimus using the dried blood spot method in combination with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009;50(4):664-670.
314. Wilhelm AJ, den Burger JCG, Vos RM, Chahbouni A, Sinjewel A. Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2009;877(14-15):1595-1598.
315. Cheung CY, Heijden Jvd, Hoogtanders K, Christiaans M, Liu YL, Chan YH, et al. Dried blood spot measurement: application in tacrolimus monitoring using limited sampling strategy and abbreviated AUC estimation. *Transplant International* 2008;21(2):140-145.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| ABBILDUNG 1: BLUTZELLEN UNTER EINEM RASTERELEKTRONENMIKROSKOP (VON LINKS NACH RECHTS: ERYTHROZYT, THROMBOZYT UND LEUKOZYT) [12]. | 6 |
| ABBILDUNG 2: PLASMAPROTEINE UND IHR PROZENTUALER ANTEIL AM GESAMTPLASMAPROTEINS [14]. | 8 |
| ABBILDUNG 3: ARBEITSWEISEN UND TECHNISCHE UMSETZUNGEN. PROBENAUFBEREITUNG UND –PROZESSIERUNG EINER NATIVEN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEIT FÜR DIE LC-MS/MS ANALYSE [71]. | 20 |
| ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON CHROMATOGRAMMEN FÜR DIE BESTIMMUNG DER DURCHBRUCHSZEIT (T_A), FÜR DIE BESTIMMUNG DER FRAKTIONIERUNGSZEIT (T_M) UND FÜR DIE BESTIMMUNG DER TRANSFERZEIT (T_T) NACH [82]. | 23 |
| ABBILDUNG 5: BERECHNUNG DER SCHALTZEITEN EINES ANALYSENZYKLUS: VENTILSCHALTZEIT (T_{V1}). | 25 |
| ABBILDUNG 6: BERECHNUNG DER SCHALTZEITEN EINES ANALYSENZYKLUS: VENTILSCHALTZEIT (T_{V2}). | 25 |
| ABBILDUNG 7: STRUKTUR UND SPEZIFIKATIONEN VON HYSHERE SORBENTIEN. | 26 |
| ABBILDUNG 8: EXTRAKTIONS- UND FRAKTIONIERUNGSMECHANISMUS VON HYDROPHIL-LIOPHIL BALANCIERTEN POLYMEREN INKLUSIVE IHRER SPEZIFIKATIONEN [IN ANLEHNUNG AN [86]. | 26 |
| ABBILDUNG 9: EXTRAKTIONS- UND FRAKTIONIERUNGSMECHANISMUS VON „RESTRICTED ACCESS MATERIALIEN“ UND IHRE SPEZIFIKATIONEN [NACH 91-92]. | 28 |
| ABBILDUNG 10: EXTRAKTIONS- UND FRAKTIONIERUNGSMECHANISMEN VON OASIS [®] MCX- UND WCX- MATERIALIEN UND IHRE SPEZIFIKATIONEN [93]. | 30 |
| ABBILDUNG 11: GLEICHUNG FÜR DIE CHROMATOGRAPHISCHE AUFLÖSUNG (R_S). | 31 |
| ABBILDUNG 12: GEOMETRISCHES PRISMA MODELL. | 33 |
| ABBILDUNG 13: RETENTIONSFAKTOR (K_{TOTAL}): DIE SUMME ALLER CHROMATOGRAPHISCHEN RETENTIONSPARAMETER AUF DEN EINZELNEN STATIONÄREN PHASEN ERGEBEN BEI MISCHPHASEN DEN RETENTIONSFAKTOR EINES ANALYTEN IM GESAMTEN SÄULENSYSTEM. | 34 |
| ABBILDUNG 14: IONISATIONSTECHNIKEN. | 36 |
| ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES IONISATIONSPROZESSES DER ELEKTROSPRAY-IONISATION [114]. | 37 |
| ABBILDUNG 16: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CHEMISCHE IONISATION UNTER ATMOSPÄRENDRUCK [121]. | 39 |
| ABBILDUNG 17: AUFBAU EINES TANDEM-MASSENSPEKTROMETERS. | 40 |
| ABBILDUNG 18: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TANDEM-MASSENSPEKTROMETRISCHEN DETEKTIONSMODI: (A) PRODUKTIONENSCAN, (B) VORLÄUFERIONENSCAN, (C) SCAN EINES BESTIMMTEN MASSENÜBERGANGS UND (D) NEUTRALTEILCHENSCAN. | 42 |
| ABBILDUNG 19: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BESTIMMUNG VON MATRIXEFFEKTEN MIT DER NACHSÄULEN- INFUSIONSTECHNIK. | 48 |

| | |
|--|-----|
| ABBILDUNG 20: TRIMETHYLAMMONIUMMETHYLPHOSPHATION. | 49 |
| ABBILDUNG 21: ANGRIFFSPUNKTE VERSCHIEDENER IMMUNSUPPRESSIVA AN T-LYMPHOZYTEN: INTRAZELLULÄRER SIGNALTRANSDUKTIONSWEG UND INHIBITIONSMECHANISMUS VON CICLOSPORIN A (CSA), TACROLIMUS (FK 506), SIROLIMUS (RAD) UND EVEROLIMUS (SDZ-RAD) [163]. | 55 |
| ABBILDUNG 22: VITALFÄRBUNG MIT TRYPANBLAU. | 72 |
| ABBILDUNG 23: KONFOKALE LASER-ELEKTRONENMIKROSKOPIE. | 74 |
| ABBILDUNG 24: KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE. | 76 |
| ABBILDUNG 25: KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE. | 77 |
| ABBILDUNG 26: DIFFERENTIELLE ZENTRIFUGATION. | 78 |
| ABBILDUNG 27: KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE HITZESCHOCK-BEHANDELTER PROBEN. | 79 |
| ABBILDUNG 28: KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE. | 80 |
| ABBILDUNG 29: KONFOKALE LASERMIKROSKOPIE. | 81 |
| ABBILDUNG 30: INSTRUMENTELLER AUFBAU DES SYMBIOSIS™ PHARMA SYSTEMS [256]. | 82 |
| ABBILDUNG 31: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES ANALYSENSYSTEMS FÜR DIE DIREKTE UND AUTOMATISCHE BESTIMMUNG VON PHARMAKA IN VOLLBLUT. | 84 |
| ABBILDUNG 32: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MODIFIZIERTEN SYMBIOSIS™ PHARMA SYSTEMS; NEU IN DAS SYSTEM INTEGRIERT WURDEN DIE BEHEIZTE EDELSTAHLKAPILLARE UND EIN ZWEITES VENTIL MIT INTEGRIERTEM T-STÜCK (SIEHE ROTE RAHMEN) [7]. | 86 |
| ABBILDUNG 33: AUSSCHNITTE AUS EINEM MISCHZYKLUS. | 92 |
| ABBILDUNG 34: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INJEKTIONSNADELGEOMETRIEN. | 93 |
| ABBILDUNG 35: MODIFIZIERTER INJEKTIONSMODUS: DURCH LUFTPOLSTER SEGMENTIERTE PROBE. | 96 |
| ABBILDUNG 36: FORMEL ZUR BERECHNUNG DER FLUSSRATE FÜR EINE IN-LINE PROZESSIERUNG. | 97 |
| ABBILDUNG 37: BESTIMMUNG DES DURCHBRUCHSVOLUMENS AUF DER ERSTEN SPE-KARTUSCHE. | 101 |
| ABBILDUNG 38: BESTIMMUNG DES DURCHBRUCHSVOLUMENS AUF DER ZWEITEN SPE-KARTUSCHE. | 102 |
| ABBILDUNG 39: BESTIMMUNG DES DURCHBRUCHSVOLUMENS AUF DER DRITTEN SPE-KARTUSCHE. | 103 |
| ABBILDUNG 40: ERGEBNIS DER BESTIMMUNG DES FRAKTIONIERUNGSVOLUMENS AUF VERSCHIEDENEN SPE- KARTUSCHEN. | 106 |
| ABBILDUNG 41: BESTIMMUNG DES FRAKTIONIERUNGSVOLUMENS AUF DER ZWEITEN SPE-KARTUSCHE. | 108 |
| ABBILDUNG 42: BESTIMMUNG DES FRAKTIONIERUNGSVOLUMENS AUF DER DRITTEN SPE-KARTUSCHE. | 110 |
| ABBILDUNG 43: BESTIMMUNG DES ELUTIONSVOLUMENS AUF DER ERSTEN SPE-KARTUSCHE. | 112 |
| ABBILDUNG 44: BESTIMMUNG DES ELUTIONSVOLUMENS AUF DER ZWEITEN SPE-KARTUSCHE. | 114 |
| ABBILDUNG 45: ERGEBNIS DER BESTIMMUNG DES ELUTIONSVOLUMENS AUF DER DRITTEN SPE-KARTUSCHE. | 117 |
| ABBILDUNG 46: ZIELE EINER POPLC-TRENNUNG. | 123 |
| ABBILDUNG 47: BESTIMMUNG DER RETENTIONSZEITEN FÜR ALLE MODELLANALYTE AUF DEN FÜNF STATIONÄREN POPLC-PHASEN. | 125 |
| ABBILDUNG 48: ÜBERLAGERUNG DES BERECHNETEN MIT DEM EXPERIMENTELL ERMITTELTEN CHROMATOGRAMM FÜR EINE POPLC-SÄULE. | 127 |
| ABBILDUNG 49: ZEITLICHE ERMITTLUNG VON MATRIXEFFEKTEN: ÜBERLAGERUNG VON INJEKTIONS-(ROT) UND INFUSIONSCHROMATOGRAMMEN (GRÜN). | 129 |

| | |
|--|-----|
| ABBILDUNG 50: REPRÄSENTATIVES CHROMATOGRAMM EINER BESTIMMUNG DER IMMUNSUPPRESSIVA AUS CDB MITTELS DER MD-SPE-POPLC-MS/MS METHODE (TRIPLE-KARTUSCHEN MODUS). | 135 |
| ABBILDUNG 51: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VOLLSTÄNDIGEN ANALYSENZYKLUS VON CDB. | 1 |
| ABBILDUNG 52: INSTRUMENTELLER AUFBAU ZUR UNTERSUCHUNG DER ROBUSTHEIT DER PROZESSIERUNGSEINHEIT. | 146 |
| ABBILDUNG 53: ROBUSTHEIT DER PROZESSIERUNGSEINHEIT: RÜCKDRUCKPROFIL ÜBER 1.000 PROZESSIERUNGSZYKLEN. | 149 |
| ABBILDUNG 54: INSTRUMENTELLER AUFBAU ZUR BESTIMMUNG DER ROBUSTHEIT DER KARTUSCHE. | 151 |
| ABBILDUNG 55: BESTIMMUNG VON TACROLIMUS AUS VOLLBLUT UND AUS CDB. | 154 |
| ABBILDUNG 56: BESTIMMUNG VON CICLOSPORIN A AUS VOLLBLUT UND AUS CDB. | 155 |
| ABBILDUNG 57: NACHWEIS VON HÄMOGLOBIN IM TRANSFERSCHRITT. | 157 |
| ABBILDUNG 58: TESTCHROMATOGRAMM EINER POPLC-SÄULE MIT 3MM INNENDRUCHMESSER. | 163 |
| ABBILDUNG 59: TESTCHROMATOGRAMM EINER POPLC-SÄULE MIT 2MM INNENDURCHMESSER. | 164 |
| ABBILDUNG 60: NACHWEIS VON MATRIXEFFEKTEN. | 1 |
| ABBILDUNG 61: NACHWEIS VON MATRIXEFFEKTEN. | 1 |
| ABBILDUNG 62: NACHWEIS VON MATRIXEFFEKTEN. | 1 |
| ABBILDUNG 63: UNTERSUCHUNGEN ZU INTERFERIERENDEN SUBSTANZEN IN DER CDB-MATRIX. | 175 |
| ABBILDUNG 64: UNTERSUCHUNG AUF RESTMATRIXSUBSTANZEN. | 178 |
| ABBILDUNG 65: UNTERSUCHUNG AUF RESTMATRIXSUBSTANZEN. | 179 |
| ABBILDUNG 66: UNTERSUCHUNG AUF RESTMATRIXSUBSTANZEN. | 1 |
| ABBILDUNG 67: REAKTIONSMCHANISMUS DER BCA-PROTEINBESTIMMUNG. | 186 |
| ABBILDUNG 68: INSTRUMENTELLER AUFBAU ZUR UNTERSUCHUNG DER REINIGUNGSEFFIZIENZ. | 188 |
| ABBILDUNG 69: KALIBRATION DER BCA-PROTEINBESTIMMUNG. | 189 |
| ABBILDUNG 70: INSTRUMENTELLER AUFBAU ZUR EVALUATION DER BIOKOMPATIBILITÄT DER VERWENDETEN KAPILLAREN. | 191 |
| ABBILDUNG 71: RÜCKDRUCKPROFILE MIT VERSCHIEDENEN MATERIALIEN DER AUSLASSKAPILLARE. | 1 |
| ABBILDUNG 72: REINIGUNGSPROFILE MIT VERSCHIEDENEN MATERIALIEN DER AUSLASSKAPILLARE. | 1 |
| ABBILDUNG 73: INFRAROTMESSUNG WICHTIGER SCHLÜSSELPUNKTE IM ANALYSENSYSTEM. | 198 |
| ABBILDUNG 74: UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER PROBENMATRIX. | 200 |
| ABBILDUNG 75: EINFLUSS DES ALTERS DES REINIGUNGSREAGENZES AUF DIE BESTIMMUNG DES „BIOFILMS“. .. | 202 |
| ABBILDUNG 76: AUFBAU EINES IN-LINE FILTERS [306]. | 203 |
| ABBILDUNG 77: GELARTIGE ABLAGERUNG AUF DEM IN-LINE FILTER. | 203 |
| ABBILDUNG 78: INTERLABORELLER VERGLEICH (PASSING-BABLOK PLOT). | 232 |
| ABBILDUNG 79: INTRALABORELLER VERGLEICH (PASSING-BABLOK PLOT). | 233 |
| ABBILDUNG 80: INTRALABORELLER VERGLEICH (PASSING BABLOK PLOT). | 234 |
| ABBILDUNG 81: INTRALABORELLER VERGLEICH (PASSING BABLOK PLOT). | 235 |

| | |
|--|-----|
| TABELLE 1: BLUTBILDPARAMETER EINES ERWACHSENEN [13]. | 7 |
| TABELLE 2: REFERENZ-HÄMATOKRITWERTE FÜR VERSCHIEDENE ENTWICKLUNGSSTADIEN DES MENSCHEN. | 8 |
| TABELLE 3: PHOSPHOLIPIDE IM PLASMA UND IN DEN ERYTHROZYTEN [14]. | 9 |
| TABELLE 4: CHROMATOGRAPHISCHE MODI UND ABKÜRZUNGEN NACH GIDDINGS [77]. | 21 |
| TABELLE 5: UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE: PARAMETER UND EINSTELLUNGEN FÜR EINE EFFIZIENTE PROBENDURCHMISCHUNG. | 94 |
| TABELLE 6: ZUGABE DES INTERNEN STANDARDS ZU EINER VOLLBLUTPROBE. MISCHUNGEN AUS VOLLBLUT/AB- PLASMA UND ORGANISCHEM MODIFIER FÜR EIN VOLLAUTOMATISCHES BLUTANALYSENSYSTEM. | 95 |
| TABELLE 7: PROZESSPARAMETER RELEVANTER PROBENMISCHUNGEN UND ENTSPRECHENDE FLUSSRATEN AUS [7]. | 97 |
| TABELLE 8: pKA-WERTE DER UNTERSUCHTEN IMMUNSUPPRESSIVA [270]. | 104 |
| TABELLE 9: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE: DURCHBRUCHSZEITEN UND DIE DARAUS BERECHNETEN DURCHBRUCHSVOLUMINA. | 104 |
| TABELLE 10: FRAKTIONIERUNGSZEITEN FÜR DIE UNTERSUCHTE MATRIX CDB AUF DEN EINZELNEN SPE- KARTUSCHEN IN ABHÄNGIGKEIT VON MOBILER PHASE UND FLUSS UND DIE DARAUS BERECHNETEN FRAKTIONIERUNGSVOLUMINA. | 111 |
| TABELLE 11: SIGNALHÖHEN UND –FLÄCHEN UND IHRE QUOTIENTEN. | 115 |
| TABELLE 12: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE BEZÜGLICH ELUTIONSZEITEN UND ELUTIONSVOLUMINA. | 117 |
| TABELLE 13: VENTILSCHALTZEITEN UND BERECHNUNGSFORMELN. | 1 |
| TABELLE 14: RETENTIONSZEITEN ALLER MODELLANALYTE UND DER INTERNEN STANDARDS AUF DEN EINZELNEN STATIONÄREN PHASEN. | 126 |
| TABELLE 15: ALLGEMEINE „TUNING“-PARAMETER FÜR EINE PARALLELBESTIMMUNG DER IMMUNSUPPRESSIVA UND DER INTERNEN STANDARDS. | 133 |
| TABELLE 16: VARIABLE „TUNING“-PARAMETER FÜR EINE PARALLELBESTIMMUNG DER IMMUNSUPPRESSIVA UND DER INTERNEN STANDARDS. | 133 |
| TABELLE 17: MD-SPE-POPLC-MS/MS METHODE (TRIPLE-KARTUSCHEN MODUS): ZEITLICHE ABFOLGE DER EINZELNEN TEILSCHRITTE DES ANALYSENZYKLUS MIT VENTILPOSITIONEN. | 139 |
| TABELLE 18: ZUSAMMENSTELLUNG UNTERSUCHTER SPE-MATERIALIEN. | 143 |
| TABELLE 19: KOMPLETTER PROZESSIERUNGSZYKLUS ZUR IMITATION EINES „BIOFILMS“. | 148 |
| TABELLE 20: BESTIMMUNG DER ROBUSTHEIT DER KARTUSCHEN. | 151 |
| TABELLE 21: NACHWEIS VON HÄMOGLOBIN IM TRANSFERSCHRITT. | 158 |
| TABELLE 22: NACHWEIS VON PROTEIN IM TRANSFERSCHRITT. | 159 |
| TABELLE 23: NACHWEIS VON EISENIONEN IM TRANSFERSCHRITT. | 160 |
| TABELLE 24: NACHWEIS VON EISENIONEN IM TRANSFERSCHRITT. | 161 |
| TABELLE 25: EVALUATION VERSCHIEDENER REINIGUNGSREAGENZIEEN. | 185 |
| TABELLE 26: ADAPTION EINER OFF-LINE BCA-PROTEINBESTIMMUNGSMETHODE ZUR VERWENDUNG IN EINEM ON- LINE SYSTEM. | 189 |

| | |
|--|-----|
| TABELLE 27: BERECHNETE MENGE AN ABGELAGERTER PROTEINMATRIX („BIOFILM“) NACH 100, 200, 300 UND 400 PROZESSIERUNGSZYKLEN UND IM VERGLEICH ZUR GESAMTPROTEINMENGE..... | 196 |
| TABELLE 28: INFRAROTMESSUNG DER AUßENTEMPERATUREN DER KAPILLAREN. | 199 |
| TABELLE 29: BESTIMMUNG DER RICHTIGKEIT UND DER PRÄZISION. | 208 |
| TABELLE 30: BESTIMMUNG DER RICHTIGKEIT. | 209 |
| TABELLE 31: KALIBRATOREN..... | 211 |
| TABELLE 32: KALIBRATIONSGERADEN UND KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN. | 211 |
| TABELLE 33: KALIBRATIONSGERADEN UND KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN. | 212 |
| TABELLE 34: KALIBRATIONSGERADEN UND KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN. | 212 |
| TABELLE 35: NACHWEIS- (LOD) UND BESTIMMUNGSGRENZEN (LLOQ). | 213 |
| TABELLE 36: WIEDERFINDUNGSRATEN (WFR). | 215 |
| TABELLE 37: WIEDERFINDUNGSRATE (WFR). | 215 |
| TABELLE 38: WIEDERFINDUNGSRATEN (WFR).. | 216 |
| TABELLE 39: RICHTIGKEIT UND PRÄZISION. | 219 |
| TABELLE 40: RICHTIGKEIT UND PRÄZISION.. | 219 |
| TABELLE 41: RICHTIGKEIT UND PRÄZISION. | 220 |
| TABELLE 42: RICHTIGKEIT UND PRÄZISION. | 1 |
| TABELLE 44: KALIBRATIONSGERADEN, KALIBRATIONSBEREICH, UND KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN. | 224 |
| TABELLE 45: NACHWEIS- (LOD) UND BESTIMMUNGSGRENZEN (LLOQ). | 226 |
| TABELLE 46: WIEDERFINDUNGSRATEN (WFR). | 228 |
| TABELLE 47: WIEDERFINDUNGSRATEN (WFR). | 229 |
| TABELLE 48: WIEDERFINDUNGSRATEN (WFR). | 229 |

Forschungsaufenthalt und Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit

Forschungsaufenthalt

Forschungsaufenthalt im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der National Science Foundation of China (NSFC) geförderten und von dem Sino-German Center for Research Promotion, Beijing, betreuten Projekts GZ364 “Sino-German Cooperation Research Group for Separation and Analysis of Complex Samples“ im Laboratory of Pharmaceutical Analysis, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Zhang Jiang Hi-Technology Park, Pudong, Shanghai, CN, 12.Oktober 2009-06.November 2009

Durchführung experimenteller Arbeiten bezüglich Kopplung von Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) und Phasen-optimierter LC (POPLC) für die on-line Aufbereitung und HPLC-Trennung von phytopharmaka Extrakten der traditionellen Chinesischen Medizin (TCM).

Poster

1. R. Morello, J. Milojković, I. Berger, K.-S. Boos
“SPE-LC-MS/MS Analysis of Immunosuppressants directly in Whole Blood using in-line Processing Procedure”
5th SymbiosisTM User Group Meeting, Delft, NL, 20.-21. September 2007

2. R. Morello, J. Milojković, I. Berger, K.-S. Boos
“In-line Processing of Whole Blood for On-line SPE-LC-MS/MS Analysis of Immunosuppressants”
Mass Spectrometry: Application to the Clinical Laboratory, San Diego Hilton Mission Bay, USA, 11. November 2008
3. I. Berger, R. Morello, K.-S. Boos
“LC-MS/MS Analysis of Drugs in Whole Blood: A unique solution for total automation and undisturbed detection”
HPLC 2010, Boston, USA, 19.-24. Juni 2010
4. R. Morello, I. Berger, M. Kinzig, K.-S. Boos
“LC-MS/MS Analysis of Immunosuppressants in Whole Blood: Comparison of dried blood spots, heat-shock or cryogenically treated blood and denatured blood”
HPLC 2010, Boston, USA, 19.-24. Juni 2010
5. R. Morello, I. Berger, M. Kinzig, K.-S. Boos
“LC-MS/MS Analysis of Immunosuppressants in Whole Blood: Comparison of dried blood spots, heat-shock or cryogenically treated blood and denatured blood”
EBF Workshop 2010, Brüssel, BL, 17.-18. Juni 2010

Vorträge

1. Irayani Berger
“Application of Phase Optimized Liquid Chromatography for SPE-LC-MS/MS Analysis of Immunosuppressants in Whole Blood”
19. Doktorandentagung des Arbeitskreises “Separation Science” der Fachgruppe “Analytische Chemie” der GDCh, Hohenroda, 12. Januar 2009

2. Irayani Berger
„Phasen-optimierte Flüssigkeitschromatographie (POPLC) und ihre Anwendung bei der Analyse von Pharmaka aus Vollblut“
Seminar, Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München, München, 12. Februar 2009
3. Irayani Berger, Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos
„Multidimensional SPE and on-line POPLC-MS/MS for the analysis of immunosuppressants in whole blood“
7th SymbiosisTM User Group Meeting, Utrecht, NL, 19. September 2009
4. Irayani Berger, Rosa Morello, Karl-Siegfried Boos
„Multidimensional SPE and on-line POPLC-MS/MS for the analysis of immunosuppressants in whole blood“
Seminar, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, CN, 19. October 2009

Publikationen

1. K.-S. Boos, R. Morello, J. Milojković, I. Berger
Durchbruch in der Analytik von Vollblut-Hitzeschock-induzierte Aufbereitung von Vollblut für die automatisierte Analytik
GIT Labor-Fachzeitschrift, 1 (2008): 19-21

2. R. Morello, J. Milojković, I. Berger, K.-S. Boos
A Unique SPE-LC-MS/MS platform for fully automated analysis of drugs in Native Whole Blood”
EHRLICH II-2nd World Conference on Magic Bullets, Nürnberg, 3.-5. October 2008, Book of Abstracts: A-219

3. J. Milojković, I. Berger, R. Morello, K.-S. Boos
Ein neuartiges Verfahren für die direkte Applikation von Vollblut in Trenn- bzw. Detektionssysteme
LC GC, deutsche Ausgabe, Juli 2009, S. 5-8